

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 426**

51 Int. Cl.:

A61N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2005 E 05791488 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1812110**

54 Título: **Aparato para el tratamiento de problemas dermatológicos**

30 Prioridad:

11.10.2004 GB 0422525

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.10.2013

73 Titular/es:

**SONOVIA HOLDINGS LLC (100.0%)
c/o Hallco Development LLC, 6001 SW Sixth
Avenue, Suite 101
Topeka, KS 66615, US**

72 Inventor/es:

LUEBCKE, PETER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 427 426 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aparato para el tratamiento de problemas dermatológicos

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a aparatos de suministro de ultrasonidos para un tratamiento de la piel, en particular para el tratamiento de problemas cosméticos de la piel y para mejorar el aspecto de la piel envejecida y/o dañada por el sol. También se describe el uso de tal aparato en métodos para tratar la piel, métodos que pueden incorporar la aplicación de ultrasonido. Se describen adicionalmente composiciones tópicas asociadas.

Antecedentes de la invención

10 La piel es una ruta potencial para el suministro de agentes farmacéutica o cosméticamente activos al cuerpo. Sin embargo, no se cree generalmente que la piel sea una ruta de suministro eficiente, debido a la baja permeabilidad del stratum corneum y de la epidermis en general. Tradicionalmente, la aplicación tópica de agentes terapéuticos farmacéuticos ha sido dirigida a sitios dermatológicos localizados. Más recientemente, se han usado técnicas transdérmicas para el suministro sistémico especialmente cuando esta ruta evita la circulación hepática donde puede ocurrir la degradación del agente activo.

15 Se puede usar ultrasonido para suministrar moléculas dentro de la piel. Cuando se usa ultrasonido en este contexto se denomina "sonoforesis". El ultrasonido aplicado a la piel tiene dos principales efectos. Primero, la cavitación es el resultado del campo de presión rápidamente oscilante, que provoca la formación y el colapso de burbujas, que mecánicamente crea canales a través del stratum corneum. El segundo efecto es el calentamiento directo del material a través del que están viajando las ondas del sonido, debido a la atenuación de la energía acústica por reflexión, absorción y dispersión. En la piel, esto ocurre hasta cuatro veces más que en otros tejidos debido a su heterogeneidad. Se sabe que el calentamiento rompe el sistema de bicapa de lípido en el stratum corneum contribuyendo también a la mejorada permeabilidad de la epidermis. Varios factores pueden afectar a la capacidad calorífica del ultrasonido, que incluyen:

- (i) aplicar ultrasonido en modo continuo en lugar de pulsado,
- 25 (ii) prolongar el tiempo de exposición,
- (iii) enfocar el ultrasonido en lugar de usar la aplicación sin enfocar,
- (iv) la evitación de usar geles acuosos que se usan para disminuir el grado de reflexión,
- (v) aplicar el ultrasonido a mayores densidades de potencia,
- (vi) la aplicación de ultrasonido a tejidos inmediatamente adyacentes al hueso.

30 Con el ultrasonido, se ha mostrado que la difusión de moléculas de bajo peso molecular se incrementa en 2-5.000 veces a través de epidermis aislada in vitro y hasta 1.700 veces en estudios teóricos. Fármacos de moléculas incluso mayores tales como insulina y heparina se han suministrado eficientemente cuando se usan 15 minutos de US de 20 kHz. Un estudio in vitro encontró que se podrían suministrar moléculas de poli-L-lisina de hasta 51 KDa con ultrasonido de 20 kHz e intensidades en el intervalo de 2 a 50 W/cm². A modo de explicación de este incremento de permeación, algunos estudios han citado un incremento en el número de poros en lugar de un incremento de los diámetros (28±12 Å) de poro individual. Sin embargo, se ha adoptado el término "sonomacroporación" para el ultrasonido específico que de hecho provoca la formación de poros más grandes.

35 La permeabilidad de la piel se incrementa por la rotura de los lípidos intracelulares por calentamiento y/o tensión mecánica, y por el incremento de porosidad. Se han publicado elevaciones de temperatura de 6°C (1 MHz, 0,25 W/cm²) a 50°C (20 MHz, 10-30 W/cm²), pero se ha mostrado que elevaciones tan pequeñas como 11°C (1 MHz, 2 W/cm²) provocan daño a la piel. El ultrasonido en modo continuo con una intensidad de 1 W/cm² eleva la temperatura del tejido a una profundidad de 3 cm hasta 40°C en 10 minutos.

45 Para moléculas menores tales como manitol, la mejora de la permeación a través de la piel ocurre cuando se aplica ultrasonido como pretratamiento o simultáneamente con la aplicación de la molécula; mientras que para moléculas grandes tales como insulina, la mejora de la permeación solo se ha registrado durante la aplicación de ultrasonido.

50 El ultrasonido se puede usar para mejorar el suministro transdérmico de fármaco. El documento WO 99/34857 describe el suministro transdérmico de fármaco de varios agentes activos usando una densidad de potencia de menos de 20 W/cm², preferentemente menos de 10 W/cm², siendo la frecuencia usada menor de 2,5 MHz, preferentemente menor de 2 MHz, preferentemente menor de 1 MHz, lo más preferentemente 20-100 kHz. Se generaron datos experimentales in vivo en ratas usando una frecuencia de 20 kHz y una densidad de potencia de 1 o 1,5 o 7 W/cm².

El documento US 4.767.402 describe el suministro de fármaco transdérmico usando ultrasonido con una densidad de potencia de 0-3 W/cm², preferentemente 0,5-1,5 MHz, y recomienda que cuando se reduce la densidad de potencia, se debe reducir también la frecuencia. Se ejemplifica una densidad de potencia de 1-2 W/cm² a una frecuencia de 870 kHz.

5 Los tratamientos cosméticos que aspiran a mejorar la calidad de la piel están también dificultados por la función de barrera de la epidermis y en particular por el stratum corneum externo. La epidermis proporciona una significativa barrera mecánica y química a la transferencia de soluto debido a la bicapa de lípido/célula cornificada. Además, hay significativa actividad enzimática en la epidermis y dermis, que proporciona una defensa bioquímica para neutralizar los xenobióticos aplicados y que es comparable a la del hígado respecto a la actividad por unidad de volumen.
10 Adicionalmente, el peso molecular de las sustancias activas se sabe que es importante para determinar su propensión a difundirse por la piel. Se sabe que la difusión de sustancias de peso molecular de alrededor de 500 Da y mayor es ineficiente. Se han descrito métodos y aparato que incluyen ultrasonido para su uso en cosmética de la piel y en tratamientos médicos.

15 El documento US 6.113.559 describe un método y aparato para reducir arrugas por aplicación de un haz de ultrasonido focalizado (densidad de potencia de ultrasonido de 100-500 W/cm², frecuencia 1-500 MHz) a una región de piel, de modo que el suministro de energía a la capa de dermis es suficiente para calentar el tejido para estimular o irritar la capa de dermis, provocando un cambio en la capa de dermis que confiere un cambio de suavidad de la capa de epidermis.

20 La terapia de ultrasonido para el tratamiento de celulitis es bien conocida y la aplicación de onda ultrasónica generalmente se ha mostrado eficaz para degradar el tejido graso subcutáneo. Como ejemplo, el documento EP 0 695 559, se refiere a equipo multifuncional para tratamientos de celulitis, que puede incluir emisores de vibraciones ultrasónicas para aplicación a, por ejemplo, los muslos del cuerpo de un paciente. Sin embargo, no se discuten las densidades de potencia y las frecuencias apropiadas. El documento GB 2303552 describe un aparato de ultrasonido útil para la reducción no invasiva de la celulitis. Los dispositivos de ultrasonido son útiles para el tratamiento
25 ultrasónico de celulitis a una frecuencia predeterminada de alrededor de 3,3 MHz y a una densidad de potencia típica de 2,8 W/cm², siendo absorbida el 50% de la energía dentro de una profundidad de 1,27 cm a 2,54 cm debajo de la superficie de la piel.

30 El documento US 6.030.374 describe un método para mejorar el transporte de un agente activo a través de la piel exponiendo la piel a ultrasonido y aplicando un agente activo a la piel por inyección. El agente activo se puede usar para reducir el aspecto de la celulitis. Para ultrasonido de frecuencia más baja, se usa una frecuencia de ultrasonido entre 25 kHz y 3 MHz con una densidad de potencia de 0,5-2,0 W/cm²; para ultrasonido de frecuencia más alta, se usa una frecuencia de ultrasonido entre 3 MHz y 16 MHz con una densidad de potencia de 0,2-1,0 W/cm².

35 El documento US 5.665.053 se refiere a un masajeador corporal de endermología que tiene generadores de ultrasonido que se controlan selectivamente por el operador. El ultrasonido de onda larga de muy baja frecuencia descrito, 10 a 40 kHz, está en el intervalo generalmente reconocido como ultrasonido disruptivo, que puede ser perjudicial para las células, y de este modo por razones de seguridad este no es apropiado para uso general excepto a muy bajos niveles de potencia.

40 El documento US 5.507.790 describe un aparato para focalizar energía de ultrasonido tal que la temperatura de un sitio dentro de una capa de tejido adiposo subcutáneo de un paciente se eleva a entre 40,0 y 41,5°C para acelerar las velocidades de la reacción de lipólisis de tejido graso local. El aparato incluye un transductor ultrasónico que suministra energía de ultrasonido de una frecuencia no revelada y a una densidad de potencia no revelada a un elemento de focalización.

45 El documento WO 99/56829 describe vendajes de ultrasonido y vendajes de conjunto de transductores de ultrasonido que se dice que son útiles para acelerar la curación de heridas colocando los vendajes de ultrasonido y los vendajes de conjunto de transductores de ultrasonido adyacentes a una herida y generando pulsos ultrasónicos.

El documento WO 99/48621 describe elementos de transductor de composite piezoeléctrico flexible de gran área y conjuntos de gran área de tales elementos de transductor que tienen suficiente flexibilidad para adaptarse a los contornos de la anatomía humana, por ejemplo, la cadera, espina dorsal. Como tal, este documento describe un aparato y el tipo descrito en el preámbulo de la reivindicación 1 adjunta.

50 Para ser efectivo, el tratamiento de problemas cosméticos de la piel, tales como envejecimiento de la piel y daño solar, debe suministrar componentes activos hasta por lo menos una profundidad de la dermis superior (papilar) y por lo tanto debe emplear un mecanismo para vencer esta efectiva barrera física y bioquímica, incluso cuando se ha deteriorado con la edad.

55 El deterioro de la piel humana debido al envejecimiento natural o "intrínseco" está caracterizado por varios síntomas. Tales síntomas incluyen el adelgazamiento tanto de la epidermis como de la dermis, un aplanamiento de la unión entre ellas, pobre curación de las heridas, termorregulación y función inmune junto con un deterioro de las propiedades mecánicas asociadas tales como resistencia al desgarro, elasticidad y función de barrera. El aspecto

visible también se deteriora dando un aspecto más áspero, arrugado y seco junto con pigmentación irregular. En la mayoría de los casos el envejecimiento de la piel es de poca importancia medica excepto en tales casos como la disminuida curación de las heridas que permite la infección y la disfunción.

5 El deterioro visible en la piel con la edad es debido a la combinación de varios cambios que ocurren más o menos concurrentemente. Este deterioro se puede acelerar por elecciones del estilo de vida tales como fumar o tomar baños de sol. Los cambios visiblemente aparentes incluyen, piel fofa, textura áspera de la piel, despigmentación, aspecto marchito y una pérdida general de esplendor. El arrugamiento, o formación de arrugas, es probablemente el síntoma más comúnmente asociado al envejecimiento de la piel y se sabe que es causado por un cambio en el tipo y distribución de las proteínas y proteoglicanos de la matriz. Similarmente, las funciones de la piel que disminuyen con la edad incluyen: reemplazo celular, reconocimiento inmune, percepción sensorial, respuesta a las heridas, respuesta vascular, producción de vitamina D, función de barrera, termorregulación, producción de sebo, depuración química, producción de sudor y protección mecánica. También puede haber cambios en el pH (de 4,5 a 5).

15 La piel envejecida está caracterizada por un grosor epidérmico disminuido y la proliferación junto con el aplanamiento del patrón de las crestas de Rete. El adelgazamiento aparente puede estar relacionado con la incrementada apoptosis en las capas basal y espinosa, junto con la dañada proliferación celular de la capa basal. La piel senescente se adelgaza, se vuelve menos elástica y tiene función de barrera reducida. Esto es porque la dermis contiene un reducido contenido celular con proteínas de la matriz inflexibles, rígidas y un número disminuido de bucles capilares. La epidermis superpuesta consecuentemente sufre porque la unión dermis-epidermis (DEJ) se aplana, dando como resultado un área de la superficie de contacto reducida ya que hay menos bucles capilares en proximidad a la DEJ. El intercambio de nutrientes y metabolitos entre las dos capas disminuye y está dañada la comunicación necesaria para mantener la integridad de la capa en respuesta a cambios en las condiciones medioambientales externas.

25 La piel no solo está sometida a procesos de envejecimiento intrínsecos o cronológicos, sino también a los medioambientales o extrínsecos. Por ejemplo, se sabe que los factores tales como la dieta, polución y fumar afectan a la velocidad de envejecimiento de la piel. Sin embargo un factor sobresale como el más potente "gerontógeno": la luz solar. Se ha sugerido que aproximadamente el 80% del envejecimiento facial es debido a la exposición al sol.

El colágeno, la elastina y otras proteínas intra- y extra-celulares de la piel son afectadas dando como resultado la elastosis solar, la acumulación de tejido elástico localizado en haces fibrosos por la epidermis.

30 El componente UV de la luz solar ha sido también relacionado con la reducción de la población celular de la epidermis (queratinocitos) y de la dermis (fibroblastos). Se ha sugerido que esto es debido al incremento de la muerte celular programada o apoptosis. Se sabe que la epidermis y la dermis se vuelven cada vez más acelulares con la edad, lo que apoya esta hipótesis. A pesar de que la epidermis influye en el aspecto seco y áspero de la piel, es la dermis la que dicta el grado de rugosidad de la superficie. La reducción y/o redistribución de las proteínas de la matriz y de los proteoglicanos de gran capacidad de retención de agua gobierna principalmente el aspecto de las arrugas y la rugosidad general de la superficie. Similarmente, las cicatrices de la piel son debidas al anormal contenido, conformación y distribución de proteínas vía la formación de tejido de granulación después del trauma, de nuevo principalmente un problema dérmico en lugar de epidérmico.

40 Los síntomas típicos de fotoenvejecimiento incluyen aspereza, arrugamiento, pigmentación irregular, telangiectasia, descamación y varios neoplasmas benignos, premalignos y malignos. El fotoenvejecimiento es predominante en caucásicos de piel clara que tienen un historial de exposición al sol y ocurre lo más severamente en la cara, cuello y superficies de extensión de las extremidades superiores. La elastosis, reconocida como empedrado, carne de gallina que aparece en el cuello y parte superior del pecho, es debida a agregaciones nodulares de fibras de elastina alterada en la dermis. Se ha observado una proliferación de fibras de elastina cada vez más gruesas y enredadas en dermis papilar y reticular de la piel expuesta al sol. Incluso en la piel ligeramente dañada por el sol, se ha encontrado un incremento de 5-20 veces en el diámetro de la fibra de elastina, con ligeros cambios en la estructura fibrilar y una alteración de la arquitectura normal, dando un aspecto alterado y "apolillado".

45 En general, el fotodaño se manifiesta por el daño progresivo a los fibroblastos dérmicos con alteraciones cuantitativas y cualitativas de la matriz extracelular de soporte. Cuando pasa la energía solar a través de la piel y es absorbida ocurre un gradiente de daño, viéndose el mayor daño en la dermis papilar externa, con menos a la dermis reticular más profunda.

50 El envejecimiento intrínseco (cronológico) está caracterizado por la atrofia de la piel con pérdida de elasticidad y actividad metabólica reducida. Específicamente, el stratum corneum permanece sin cambiar, pero la epidermis se adelgaza globalmente, con un aplanamiento de la unión dermis-epidermis dando como resultado fragilidad incrementada de la piel. El grosor dérmico y la vascularidad dérmica disminuyen; esto va acompañado de una disminución del número y de la actividad biosintética de los fibroblastos dérmicos. Este último cambio se manifiesta por la curación retrasada de las heridas. El incremento de edad también tiene el efecto de reducir la respuesta de los queratinocitos y fibroblastos a los factores de crecimiento.

A nivel molecular y ultraestructural, hay cambios en elasticidad y otros cambios en las proteínas de la matriz. Por lo

- que respecta a la elasticidad, hay una reducción de la proteína extracelular fibrilina que es un componente principal de los haces de microfibrillas que conectan la unión dermis-epidermis a la dermis papilar. Estos haces, denominados a menudo fibras de oxitalan, esencialmente proporcionan una conexión elástica entre la epidermis y la dermis. Considerado previamente que eran sintetizadas solo por los fibroblastos, se ha mostrado que las fibras presentes en la unión dermis-epidermis son sintetizadas por queratinocitos. Se ha encontrado que la concentración de fibrilina en la piel fotoenvejecida disminuye y ha mostrado ser un biomarcador útil para el fotoenvejecimiento ya que se sabe que está conectada con la formación de arrugas. La concentración de fibrilina se reduce también en la piel que se ha sometido a ensayos de tracción y exhibe estrías (striae distensae).
- Las proteínas in vivo son modificadas post-translacionalmente por una reacción no enzimática (reacción de Maillard) entre proteínas (tanto intra- como extra-celularmente) y azúcares. Esta reacción es conocida como glicación, o glicosilación, y es bien reconocido que juega una parte importante en la producción de proteínas, remodelación tisular, diabetes y envejecimiento. En la piel, este procedimiento es exacerbado por UV, aumentando la glicación dérmica significativamente después de 35 años. La glicación de proteínas ocurre cuando los azúcares reductores tales como glucosa y fructosa, o sus intermedios reactivos tales como glicoxal, reaccionan con los grupos amino de proteínas de larga semivida tales como colágeno ($t_{1/2} = 15$ años en la piel humana) y elastina en la dermis. Como resultado de este proceso, se acumulan productos finales de glicación avanzada (AGEs) citotóxicos.
- Se ha visto un incremento de glicación en piel previamente irradiada con UV. Un biomarcador bien conocido para la glicación de proteínas, carboximetilisina (CML), se ha mostrado que está presente predominantemente en áreas de elastosis solar en la dermis y generalmente a concentraciones más altas en piel fotoenvejecida, sugiriendo que la oxidación inducida por UV puede acelerar la formación de AGEs en piel fotoenvejecida.
- La acumulación de AGEs tiene varios efectos. Las proteínas de producto final de glicación avanzada son sensibilizadores endógenos del daño celular fotooxidativo en piel humana por generación inducida por UVA de especies de oxígeno reactivo (ROS) que contribuyen al fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis. La generación de ROS ha estado relacionada también con las etapas previas y posteriores de la formación de AGE con una relación directa con la velocidad de generación de ROS que a su vez incrementa la expresión de metaloproteinasas de la matriz con una consecuente disminución de matriz digerible sana. Hay también reticulación de proteínas extracelulares que provoca deterioro de las propiedades mecánicas estructurales de la proteína y reduce su susceptibilidad a las enzimas naturales del cuerpo, tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que normalmente aseguran una renovación regular de proteína sana. Los AGEs de reticulación incluyen especies tales como pentosidina. Los AGEs no de reticulación incluyen especies tales como CML. La glicación disminuye también la accesibilidad a agua de las proteínas haciéndolas más estables térmicamente y menos probable que se desnaturalicen térmicamente.
- El cuerpo tiene un montón de mecanismos fisiológicos que lo defienden de las modificaciones nocivas de proteínas, incluyendo las enzimas que digieren proteínas. La oportuna proteólisis retira las proteínas dañadas antes de que sufran daño oxidativo y reticulación. Por lo tanto, la proteólisis rápida y efectiva es un mecanismo anti-envejecimiento. Se ha mencionado ya que las proteínas tales como colágeno y elastina, que han sido modificadas post-translacionalmente por medio de la glicación inducida por UV, son más resistentes a la digestión por las enzimas endógenas (por ejemplo, metaloproteinasas). Esto, unido al incremento de la expresión de tales enzimas, reduce adicionalmente la relación de proteínas de la matriz digeribles sanas a las proteínas dañadas modificadas.
- No solo se renuevan proteínas nativas por medio de enzimas endógenas tales como colagenasa y elastasa, sino que están presentes otros sistemas tanto intra- como extra-celularmente para encargarse del envejecimiento y/o de las proteínas desnaturalizadas/estresadas. Uno de tales mecanismos emplea chaperones moleculares. El incremento de edad está asociado a una capacidad reducida de mantener la homeostasis en todos los sistemas fisiológicos y esto puede ser el resultado, en parte por lo menos, de un declive paralelo y progresivo de la capacidad de producir proteínas de choque térmico. Una respuesta de proteína de choque térmico atenuada puede contribuir a una susceptibilidad incrementada a los retos medioambientales en individuos envejecidos.
- Las proteínas de choque térmico (HSPs), también conocidas como proteínas de estrés, se cree que actúan como chaperones moleculares ayudando a la síntesis, transporte, plegamiento y degradación de proteínas. Son un grupo de proteínas que están presentes en las células, en todas las formas de vida. Se inducen cuando una célula sufre estrés medioambiental, calor, frío o privación de oxígeno. Las HSPs están también presentes en células en condiciones perfectamente normales y han sido relacionadas con la modulación de las respuestas de contracción y relajación en el músculo liso vascular; juegan un papel importante en el plegamiento y función de proteínas, incluso en ausencia de estrés.
- La formación de productos finales de glicación avanzada provoca la reticulación irreversible de proteínas sin plegar y otras modificaciones químicas. Se sabe que las HSPs promueven el repliegue/mantenimiento de la conformación y también la rápida degradación de proteínas irreversiblemente dañadas. Se sabe que las pequeñas proteínas de choque térmico, tales como α -cristalina protegen las proteínas del cristalino de los cambios inducidos por la glicación. Se sabe que las proteínas de choque térmico (sHSPs) pequeñas tienen un núcleo común "cristalina" que parece ser responsable de la actividad catalítica de estos chaperones. Se ha sugerido que un mayor entendimiento

de la acción del chaperón de α -cristalina/sHsp tendrá implicaciones para el desarrollo de productos terapéuticos para tratar y prevenir las cataratas.

5 La familia de la proteína de choque térmico incluye la ubiquitina de 8 kD (conocida con respecto al camino de degradación de la proteína ubiquitina-proteasoma), heme oxigenasa-1 de 32 kD (relacionada con el estrés oxidativo inducido por UV) y HSP-47, un conocido chaperón de colágeno. El HSP-27 se ha encontrado en piel humana y se ha sugerido que juega un papel protector en las enfermedades inflamatorias debido a sus uniones con la interleukina-1 y el factor α de necrosis tumoral. Esto, junto con el conocimiento de que la expresión de HSP-27 está muy relacionada con la diferenciación de queratinocitos epidérmicos sugiere que las proteínas de choque térmico tales como la HSP-27 juegan un papel en la protección de la piel y posiblemente en el ciclo de inflamación de quemaduras por el UV del sol. En contraste con otras células y sistemas orgánicos, se sabe que los queratinocitos epidérmicos se expresan HSP-72 constitutivamente, es decir, sin exposición a estrés previo. Se ha mostrado que la proteína de choque térmico HSP47 es importante como chaperón molecular para la síntesis de precolágeno en fibroblastos humanos. La síntesis de HSP47 se reduce en la piel envejecida y fotoenvejecida.

15 La expresión de HSP después de la exposición a UV ha sido relacionada con la resistencia incrementada a la muerte celular inducida por UV. Los inductores no tóxicos de HSPs pueden proteger frente a los efectos inmediatos y a largo plazo de la exposición a UV. Los estudios han mostrado que la exposición previa de células a luz roja o infrarroja (IR) los protege de la exposición subsecuente a luz UV. Similarmente, el pretratamiento con IR de células protege también a las células del subsecuente estrés térmico letal (51°C) aplicado.

20 El bien conocido efecto protector de HSPs del estrés medioambiental no es constante con la edad. La respuesta de HSP al estrés se atenúa con la edad, probablemente a nivel transcripcional. Se ha encontrado que el choque térmico ligero repetitivo (RMHS) de fibroblastos de piel humana reduce la velocidad de los cambios relacionados con la edad. Un estudio ha relacionado la disminución relacionada con la edad de la capacidad de los fibroblastos humanos para reducir la acumulación de proteínas glicadas con una reducción paralela de la capacidad de expresar HSP70, ya que los fibroblastos humanos expuestos a RMHS exhibían incrementada expresión de HSP70 y reducida acumulación de acumulación de proteína glicada. Los efectos beneficiosos de RMHS han sido atribuidos a la incrementada actividad proteosómica, incrementada capacidad para descomponer H_2O_2 , reducida acumulación de lipofuscina y una mejorada resistencia a la radiación UVA.

30 Se ha mostrado que las elevaciones de temperatura de 3-5°C sobre la referencia en los músculos provocan la inducción de HSPs. Se ha demostrado la inducción de HSPs por 30 minutos de ultrasonido pulsado aplicado a la temperatura normal de cuerpo en los embriones de rata, mostrando que la respuesta de choque térmico no es específica del calor sino que puede ocurrir en respuesta a estrés mecánico. Similarmente, los embriones de pollo expuestos a ultrasonido, sin ninguna contribución térmica significativa, han mostrado síntesis elevada de HSP72 sugiriendo que el estímulo mecánico puede inducir una respuesta de estrés. Se concluyó también que para producir un efecto biológico total, el estrés debe ser constante durante aproximadamente 10 s o más durante cualquier intervalo de tiempo durante la exposición. Es posible que los efectos acumulativos puedan estimular la producción de HSP como se ha encontrado cuando el choque térmico ligero se repitió durante 3 días provocando niveles de HSP en músculo significativamente elevados.

40 Ciertas sustancias tienen un efecto sobre la expresión de HSP. Por ejemplo, se ha mostrado que la salicina reduce el grado necesario de elevación de temperatura de 42°C a 39°C para obtener la expresión de HSP y para reducir el grado del subsecuente daño inducido por UV en fibroblastos y queratinocitos humanos cultivados. Conocidos irritantes como el laurilsulfato de sodio (SLS) también inducen la expresión de HSP. El aumento de HSP27 debido a la aplicación de SLS a piel humana extirpada se ha usado como método para determinar el estrés celular debido a la irritación química. En un estudio similar, sin embargo, la expresión inducida por SLS de HSP27 en epidermis humana se suprimió por la aplicación tópica de vitamina C.

45 Se ha mostrado que la sustancia cinc-L-carnosina, también conocida como Polaprezinc comercialmente, induce la expresión de HSP72 (HSP70 inducida por estrés) en células de protección de la mucosa gástrica del estrés aplicado por irritación química. Como control, se ensayaron también $ZnSO_4$ y carnosina y se encontró que no producían la misma respuesta. Conocido como fármaco antiúlceras, la acción curativa de heridas de la cinc-L-carnosina ha sido relacionada con su respuesta proliferativa en células no endoteliales tales como fibroblastos.

50 Se ha investigado la influencia de aspirina en la expresión de HSP70 en ratas intactas sometidas a estrés térmico. A las ratas se les inyectó intraperitonealmente aspirina (100 mg/kg) o vehículo solo, 60 minutos previamente a su colocación a 37°C o temperatura ambiente durante 30 minutos. La combinación de aspirina con el tratamiento térmico dio como resultado niveles de 3 a 4 veces más altos de mRNA de HSP70 con relación a los vistos con el tratamiento térmico solo.

55 Se ha investigado el papel del HSP-72 y -70 en conferir resistencia al ataque con aspirina de la mucosa gástrica de rata; se elevó la expresión de estas HSPs después de la exposición crónica a aspirina.

Se sabe que los analgésicos tales como aspirina, ibuprofeno y paracetamol protegen de las cataratas. Esta acción se ha atribuido a la inhibición de la reticulación inducida por azúcar en HSPs pequeñas tales como α -cristalina. Las

enzimas que protegen de las cataratas son tendentes a la inactivación inducida por glicación, pero se ha mostrado que la aspirina protege de esto.

5 Similarmente, se ha reconocido a la acetil-L-carnitina como potencial agente de protección de los chaperones debido a sus capacidades para acetilar potenciales sitios de glicación de HSPs pequeños y en consecuencia protegerlos del daño a la proteína mediado por glicación.

10 Las proteínas de choque térmico pequeñas (sHSPs) y Clusterina son chaperones moleculares que comparten muchas similitudes funcionales a pesar de su carencia de significativa similitud de secuencia. Las proteínas de choque térmico son proteínas intracelulares ubicuas mientras que la clusterina se encuentra generalmente extracelularmente. Ambos chaperones previenen la agregación amorfa y precipitación de proteínas diana en condiciones de estrés tales como elevada temperatura, reducción y oxidación. La transcripción tanto de HSPs como de clusterina es mediada por el factor de transcripción HSF-1. Sin embargo, se ha mostrado que la clusterina es mucho más eficiente que ciertos sHSPs, tales como α -cristalina, para prevenir la precipitación en disolución de proteínas diana estresadas.

15 La clusterina se expresa como proteína heterodímera de 75-80 kDa que está muy glicada tal que el 30% de su masa comprende azúcar. Mientras que la actividad de chaperones de proteínas de choque térmico pequeñas tales como α -cristalina se reduce significativamente a pH más bajo, la actividad de la clusterina se mejora a pH más bajo. Esto tiene importantes aplicaciones para sitios de daño o inflamación tisular en los que ocurre acidosis (pH<6) local. Otra similitud que comparte la clusterina con la sHSPs es la capacidad de regular la apoptosis. La sobreexpresión de clusterina puede proteger las células de varios agentes (por ejemplo, THF- α e irradiación UV) que si no inducen

20 apoptosis. Se ha sugerido que la clusterina puede interactuar con proteínas de la superficie de la célula estresada para inhibir la transducción de la señal pro-apoptótica o prevenir interacciones inapropiadas de proteínas intracelulares durante el estrés.

25 Muchas preparaciones para la piel tópicas están disponibles para el tratamiento de problemas médicos de la piel y para el tratamiento de problemas cosméticos de la piel, en particular envejecimiento de la piel y daño por el sol. En muchos casos estas preparaciones no son efectivas, con solo mínima o corta eficacia. Hay de este modo un deseo de nuevas preparaciones efectivas en el tratamiento de problemas de la piel. Además, la presente invención se refiere a los problemas de conseguir suministro eficiente a la piel de tales nuevas preparaciones.

Descripción de la invención

30 La invención proporciona un aparato para la aplicación de ultrasonido a la piel que comprende una pluralidad de elementos transductores de ultrasonido dispuestos en un conjunto en un material flexible en configuración espaciada y un generador de ultrasonido conectado al conjunto de transductores para energizar los elementos transductores de ultrasonido con señales de activación, caracterizada porque el generador de ultrasonidos está configurado para generar señales de activación tanto de baja como de alta frecuencia para energizar los elementos transductores de ultrasonido para suministrar ultrasonido a baja y alta frecuencia simultánea o secuencialmente a un área de la piel, y

35 en la que baja frecuencia se define como de 20 a 500 kHz y alta frecuencia se define como de 0,5 a 3,5 MHz.

Se exponen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones dependientes adyacentes.

El conjunto debe ser suficientemente flexible para permitir doblar hasta una curvatura de 3-4 cm de radio, preferentemente para permitir doblar hasta una forma alrededor de superficies doblemente curvadas así como superficies simplemente curvadas.

40 La aplicación de ultrasonido que usa un aparato según la invención se puede usar como pretratamiento antes de la aplicación de una composición de la invención, o se puede aplicar a la piel una composición de la invención directamente o vía material impregnado con la composición, por ejemplo, una almohadilla, tal como una almohadilla de gel, y a continuación suministrar el ultrasonido vía el conjunto flexible. El conjunto de ultrasonido flexible se puede acoplar a una almohadilla desechable delgada (2-3 mm) que contiene la composición y acopla la energía de ultrasonido. Apropriadamente el conjunto flexible se puede fijar, directa o indirectamente (por ejemplo, vía una almohadilla) a la piel durante la duración del tratamiento.

45

Los elementos transductores del conjunto están preferentemente herméticamente cerrados, por ejemplo, contenidos dentro de un material flexible impermeable capaz de rendimiento eléctrico incluso cuando están adheridos/acoplados a formulaciones acuosas.

50 En el aparato, se prefiere que el material flexible esté por lo menos aproximadamente acústicamente emparejado, a uno o preferentemente ambos elementos transductores, para inhibir la generación de reflexiones en el material que puedan desviar o si no disipar las ondas de ultrasonido. El material flexible puede comprender un material polimérico seleccionado de termoplásticos, termoendurecibles, cauchos o sus mezclas. El material flexible acústicamente emparejado se formará ordinariamente de un material polimérico, y opcionalmente, una carga. El material polimérico

55 debe tener buena compatibilidad con los componentes del elemento transductor, biocompatibilidad y flexibilidad. Los materiales poliméricos apropiados incluyen termoplásticos tales como polietilenos de alta densidad, poli(metacrilatos

de metilo), polipropilenos, poli(tereftalatos de butileno), policarbonatos, poliuretanos tales como CA 118 y CA 128 disponible de Morton Chemical y poliéster Estano, y similares; compuestos termoendurecibles tales como epoxis tales como epoxi Spurr y Stycast 80, Stycast 1365-65 y similares; y cauchos tales como cauchos de silicona tales como la dispersión 236 disponible de Dow Corning y RTV-141 disponible de Rhone-Poulenc, Inc. y similares, si se desea, la impedancia acústica de los materiales poliméricos se puede incrementar por la incorporación de una o más cargas. Las cargas apropiadas incluyen PZT, wolframio, alúmina, vidrio de sílice, carburo de wolframio, titanio, polvo de vidrio y similares siendo el polvo de vidrio el preferido. El tamaño de las partículas de carga debe estar en el intervalo de alrededor de 0,1 a alrededor de 50 micrómetros y preferentemente de alrededor de 0,5 a alrededor de 5 micrómetros. La cantidad de carga empleada será la cantidad necesaria para impartir la impedancia acústica deseada. Normalmente, se emplea de alrededor de 2 a alrededor de 50 por ciento de carga por volumen y preferentemente de alrededor de 5 a alrededor de 30 por ciento de carga. Un material polimérico preferido es caucho de silicona.

Típicamente los elementos transductores estarán individualmente conectados al generador de ultrasonido.

Un aparato según la invención puede comprender un conjunto flexible que tiene un conjunto de elementos transductores de alta frecuencia y un conjunto de elementos transductores de baja frecuencia respectivamente capaces de suministrar ultrasonido de alta y baja frecuencia. Los transductores de alta y baja frecuencia pueden ser alternos, o si no dispuestos según un patrón, por ejemplo, una disposición sustancialmente regular de los dos tipos de transductores. En otras realizaciones los elementos de alta y baja frecuencia pueden estar montados conjuntamente, por ejemplo, uno encima de otro, en particular coaxialmente. En este aspecto los elementos transductores pueden ser elementos transductores de frecuencia dual capaces de suministrar ultrasonido de baja y alta frecuencia secuencial o simultáneamente, a lo largo de un solo eje. Los transductores de frecuencia dual pueden estar dispuestos en un patrón, por ejemplo una disposición sustancialmente regular de transductores de frecuencia dual. Los transductores pueden ser de forma circular u otra forma regular o irregular. Los elementos transductores apropiadamente comprenden materiales transductores conocidos en la técnica, por ejemplo, piezocerámicas, PVDF, y/o materiales piezoeléctricos tales como polvos de PZT comercialmente disponibles de Morgan Matroc, Inc., cerámica, ferroeléctrico relaxor de un solo cristal, titanato y circonato de plomo $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$, metaniobato de plomo $\text{Pb}(\text{Nb}_2\text{O}_6)$, titanato de plomo modificado PbTi_3 tal como $(\text{Pb}_1 \text{Ca})\text{TiO}_3$ y $(\text{Pb}, \text{Sr})\text{TiO}_3$, titanato de bario BaTiO_3 , $\text{PMN-PT}_{(1-x)} \text{Pb}(\text{Mg}^{2+}3\text{Nb}_2/3) \text{O}_3\text{-xPbTiO}_3$, $\text{PZN-PT/BTNb}_2/3\text{O}_3\text{-x}(\text{yPbTO}_3\text{-}(1-\text{y})\text{PbZrO}_3)\text{Pb}(\text{Zn}_1/3\text{Nb}_2/3)\text{O}_3\text{-xPbTiO}_3\text{-BaTiO}_3((1-x)\text{Pb}(\text{Zn}_1/3, \text{ y similares.}$

En un aparato según la invención, los elementos transductores pueden ser capaces de suministrar el componente de baja frecuencia en modo pulsado y el componente de alta frecuencia en modo continuo, o más preferentemente capaces de suministrar el componente de ultrasonido de baja frecuencia en modo continuo y el componente de ultrasonido de alta frecuencia en modo pulsado. El modo pulsado puede ser controlable, de tal modo que es variable, para proporcionar regímenes de pulsado variables, por ejemplo, 2 ms on, 8 ms off (ciclo de trabajo de 20%).

En un aparato según la invención, apropiadamente los elementos transductores son capaces de suministrar una baja frecuencia de ultrasonido de ~ 50 kHz y/o una alta frecuencia de ultrasonido de ~1 MHz hasta 3 MHz. La densidad de potencia media espacial de la energía de ultrasonido de baja frecuencia es apropiadamente de 20 a 500 mW/cm^2 . La densidad de potencia media espacial de la energía de ultrasonido de alta frecuencia es apropiadamente de 0,5 a 3 W/cm^2 .

También se describe un elemento transductor de frecuencia dual que comprende un elemento transductor de alta frecuencia y un elemento transductor de baja frecuencia. Preferentemente, los elementos transductores de alta y baja frecuencia están coaxialmente montados y pueden estar mecánica y eléctricamente conectados. El elemento transductor de alta frecuencia puede comprender preferentemente un material piezocerámico y el elemento transductor de baja frecuencia puede comprender preferentemente PVDF. Los elementos transductores de alta y baja frecuencia pueden estar unidos conjuntamente, opcionalmente con un elemento separador entre ellos, que puede ser un elemento separador metálico.

Un aparato según la invención puede comprender un conjunto de elementos transductores de frecuencia dual como se describe aquí.

El conjunto de ultrasonido se puede programar para suministrar una secuencia deseada de alta y/o baja frecuencia de ultrasonido, en modo pulsado o continuo, en patrones fijados, evitando con ello problemas de baja o sobreexposición de la piel al ultrasonido, que puede provocar sobrecalentamiento de la piel. Un aparato de la invención es controlable de tal modo que las bajas y altas frecuencias son capaces de ser controladas de modo que el campo de ultrasonido se mueve a través del conjunto con un patrón predeterminado y a una velocidad predeterminada, por ejemplo, 1-3 segundos de izquierda a derecha a través de todo lo ancho (por ejemplo, 5-10 cm) del conjunto a continuación 2-3 segundos de vuelta de nuevo, es decir, 4-6 segundos de tiempo del ciclo, o en el centro del conjunto y a continuación hacia afuera de nuevo, especialmente si el conjunto tiene geometría de forma circular. El patrón se puede variar durante la misma sesión de tratamiento, por ejemplo, de izquierda a derecha a continuación de arriba abajo. Idealmente la alta y baja frecuencia se aplican de modo que cada frecuencia cubra el área que se

está tratando tan uniformemente como sea posible. El conjunto flexible está configurado preferentemente tal que el ultrasonido no se aplique al ojo y tal que los transductores estarán ubicados y controlados de tal modo que se minimice la posibilidad de sobreexposición al ultrasonido de la piel que está en la proximidad de hueso (por ejemplo, huesos de la mejilla o la órbita del ojo). Esto se puede conseguir por aplicación de ultrasonido en modo pulsado y por ejemplo, por el suministro de ultrasonido en una predeterminada secuencia del conjunto en fase. El uso de máscara, parche o parches para aplicar ultrasonido es particularmente apropiado para uso doméstico.

El aparato puede comprender una unidad de alimentación y control, que es apropiadamente de un tamaño apropiado para permitir sostenerla en la mano. La unidad está preferentemente provista de una envoltura impermeable/lavable. Se puede suministrar energía de baterías, por ejemplo, baterías recargables, para permitir su uso lejos de tomas de suministro de corriente. La unidad está preferentemente provista de controles para permitir al usuario seleccionar los ajustes para un tratamiento deseado, estos pueden incluir niveles predeterminados para permitir al usuario seleccionar los ajustes para diferentes usos, por ejemplo, para tratamientos antienvjecimiento, tratamiento de celulitis o para reducción de cicatrices, estando los distintos parámetros basados en diferentes parámetros de frecuencia y amplitud/potencia. Apropiadamente la unidad de control puede incluir un tiempo máximo de corte para prevenir la sobre-exposición, por ejemplo, 10 minutos. Se puede proporcionar una función de memoria, por ejemplo, para registrar la fecha y/o duración del tratamiento.

Se describe adicionalmente un sistema de tratamiento ultrasónico que comprende una pluralidad de elementos (15) transductores dispuestos en forma de un conjunto (2) y mantenidos cerca entre sí por material (4) flexible, que es apropiadamente caucho de silicona (figuras 1a, b y c).

Cada elemento (15) puede comprender dos componentes, un elemento transductor de alta frecuencia, por ejemplo, un elemento (5) de disco piezocerámico y un elemento transductor de baja frecuencia, por ejemplo, un elemento (7) de pvdf colocados de modo que el electrodo polarizado positivo de cada elemento esté mecánica y eléctricamente conectado a la interfase (9). La superficie (30) superior del elemento (5) de PZT y la superficie (31) inferior del elemento (7) de pvdf están conectadas juntas eléctricamente (figura 1(d)). Cada elemento (1) está individualmente conectado a una fuente de alimentación descrita en la figura 3 vía conectores (8) unidos a contactos (3) yuxtapuestos sobre la placa (6) flexiblemente montada de la figura 1a. El conjunto transductor se puede conectar a continuación a un generador de ultrasonido vía los conectores (11).

Las figs 2a y 2b muestran una forma particular del elemento transductor en la que el disco (12) de PZT está unido conductivamente al elemento (13) metálico que a su vez está unido conductivamente a un material (24) de pvdf vía el anillo (23) metálico y el anillo (22) separador aislante. La conexión (9) HT común se consigue vía el anillo (21) conductor. Se generan frecuencias alternas de 50 kHz y 1 MHz por circuitos individuales en el sistema de la figura 3B o vía un chip de DDS en la figura 3A. El transductor combinado se energiza de esta manera alternativamente en pulsaciones de onda sinusoidal de 50 kHz y 1 MHz. La longitud y relación de las señales de activación se pueden controlar con procesador o derivar de un control de sensores relacionados con características medidas del tejido diana.

En la figura 2a, el elemento (13) se puede formar como dispositivo de focalización dando forma a la superficie inferior con un perfil de focalización conformado, por ejemplo, un perfil cóncavo, impartiendo de este modo similares propiedades a la película de pvdf geoméricamente ajustable.

Se describe más adicionalmente una composición que comprende uno o más agentes antiglicación, uno o más antioxidantes, un excipiente o excipientes dermatológicamente aceptables y opcionalmente una o más sustancias capaces de inducir la expresión de un chaperón molecular.

Tales composiciones son útiles en el tratamiento de problemas cosméticos de la piel, en particular actuando para mejorar el aspecto de piel envejecida, especialmente mejorando los efectos del daño del sol. Usualmente, el o cada agente antiglicación está presente de alrededor de 0,5 a 5%, preferentemente de alrededor de 1 a 3% peso/peso de la composición.

Apropiadamente, en algunas de tales composiciones, el(los) agente(s) antiglicación también tiene(n) actividad antioxidante.

Los agentes antiglicación preferidos para la incorporación en las composiciones incluyen uno o más de dipéptido que contiene histidina, alanil-L-histidina (L-carnosina) o uno de sus péptidos miméticos, N-acetilcisteína, aminoguanidina, d-penicilamina, ácido acetilsalicílico (aspirina), paracetamol, indometacina e ibuprofeno y/o un homólogo funcional, derivado o uno de sus profármacos.

Se sabe que los dipéptidos naturales que contienen histidina, tales como L-carnitina (β -alanil-L-histidina, o "carnosina") son efectivos contra diferentes radicales libres derivados de oxígeno, y también radicales lipoperoxilo. La carnosina, presente en altas concentraciones en tejido muscular esquelético puede retrasar la senescencia y provocar el rejuvenecimiento celular en fibroblastos humanos cultivados. El mecanismo por el que tan simple molécula induce estos efectos no es conocido a pesar de las bien documentadas actividades antioxidantes y eliminantes de radicales libres de oxígeno de la carnosina. Además de las acciones profilácticas de la carnosina,

puede también participar directamente en la inactivación/eliminación de proteínas envejecidas posiblemente por reacción directa con los grupos carboxilo en las proteínas. Los destinos posibles de estas proteínas carnosiniladas incluyen la formación de lipofuscina inerte, proteólisis vía el sistema de proteasoma y exocitosis después de interacción con receptores.

5 Se cree que la carnosina puede marcar proteínas glicadas para su retirada. La renovación de proteínas se basa en la hidratación para la desnaturalización térmica y se sabe que las proteínas glicadas tienen más altas entalpías de desnaturalización que obviamente las hacen menos degradables. Se ha sugerido que la “carnosinilización” de proteínas glicadas puede incrementar la superficie accesible al agua de tales proteínas y por lo tanto promover la hidratación y despliegue durante la desnaturalización térmica. Esta teoría se ha confirmado observando menor ΔH y ΔG de desnaturalización para las proteínas glicadas carnosiniladas.

10 La carnosina actúa como un agente antiglicación, inhibe el ataque del carbonilo por metilglioxal (MG) y por la carboximetilisina (CML) de AGE. Se ha mostrado que la carnosina misma se glica fácilmente por varios azúcares formando aductos no mutágenos y su papel protector se ha atribuido al efecto de prevenir la glicación de cristalina, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Se ha encontrado que la carnosina ofrece una superior eficacia y perfil de toxicidad cuando se compara con el agente antiglicación aminoguanidina, de este modo la carnosina es un agente antiglicación preferido.

15 La carnosina exhibe propiedades de quelación de Mn^{+} y de eliminación de ROS, pero esto solo no puede explicar adecuadamente el efecto que tiene en el rejuvenecimiento de fibroblastos senescentes. Un estudio ha atribuido sus propiedades a la reacción de la carnosina con grupos carbonilo sobre las proteínas glicadas/oxidadas y otras moléculas; esta reacción denominada “carnosinilación” inhibe la reticulación de proteínas glicosidizadas a macromoléculas normales; y la carnosinilación podría afectar al destino de los polipéptidos glicoxidizados. Estudios en fibroblastos embrionarios de rata demostraron que la L-carnosina sostiene la retención de la morfología celular incluso durante una agresión nutricional durante cinco semanas. Además, la L-carnosina reduce significativamente la formación de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OH dG) en las células después de cuatro semanas de cultivo continuo.

20 De este modo se podría inferir que el efecto antisenescente de la L-carnosina está probablemente relacionado con su inhibición de la formación de 8-OH dG intracelular durante el estrés oxidativo. La carnosina también extiende la duración de fibroblastos humanos cultivados, mata las células transformadas, protege las células de los aldehídos y un fragmento de péptido amiloide e inhibe la glicación de proteína in vitro y la reticulación de ADN/proteína. Los fibroblastos retienen un aspecto juvenil en presencia de carnosina, y reversionan a un fenotipo senescente cuando se retira la carnosina.

30 Además de la actividad antioxidante antiglicación, la carnosina tiene también una acción antiinflamatoria. La proteína desnaturalizada en el sitio de la inflamación es más susceptible a la glicación, por consiguiente el efecto antiinflamatorio puede mejorar la inhibición de la glicación.

35 La carnosina es soluble en agua y esto sugiere que puede representar la contrapartida en fase acuosa a los antioxidantes liposolubles tales como α -tocoferol que actúan para proteger las membranas celulares. Se encontró que la carnosina y los compuestos relacionados con la carnosina (CRCs) (imidazol, histidina, anserina), y ergotioneína eran igualmente eficientes en la eliminación del oxígeno singlete. Durante la generación de radicales hidroxilo de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton, se encontró que la carnosina era más efectiva que los CRCs ensayados. Sin embargo, el siguiente orden de clasificación de eficiencia de los compuestos relacionados con carnosina ha sido demostrado midiendo la oxidación de lipoproteínas de suero humano: acetilcarnosina < acetilanserina < homocarnosina = ofidina < carnosina < anserina mientras que los aminoácidos del componente de carnosina, histidina y alanina, han mostrado poca o ninguna acción inhibitoria contra la oxidación de lípido o proteína. Los niveles naturales de carnosina disminuyen con la edad en paralelo a las actividades de otros sistemas antioxidantes tales como el sistema superóxido dismutasa (SOD). Adicionalmente, la carnosina misma puede proteger de la fragmentación por radical peróxido de proteína en Cu,Zn -SOD, que si no inactivaría la enzima. La carnosina es bien conocida por su actividad de eliminación del oxígeno singlete.

40 Se ha mostrado que la carnosina compleja Cu^{2+} dimeramente, esto puede explicar por qué la carnosina reduce la producción de radicales libres, ya que la complejación del metal reducirá los niveles disponibles de Cu^{2+} y Fe^{2+} que si no sería coordinadamente unida por los AGEs en proteínas (el anillo de imidazol de la carnosina se puede comparar con el de muchos retículos de AGE diferentes que contienen imidazol) conduciendo a la producción in situ de hidroxilo y otras especies de oxígeno reactivo. La carnosina también interfiere con la oxidación de fosfolípido inducida por hierro/ascorbato.

45 La carnosina produce relajación vascular dependiente de la dosis (vasodilatación) que es independiente del endotelio. De manera interesante, en el mismo estudio, se ha encontrado que los aminoácidos componentes de carnosina L-histidina y alanina no producen efecto y vasoconstricción dependiente de la dosis respectivamente.

50 La carnosina se hidroliza fisiológicamente en sus aminoácidos componentes: histidina y β -alanina. Se cree que la β -alanina ha estado implicada en la promoción de la síntesis de colágeno. La histidina es conocida por sus propiedades antiinflamatorias, su capacidad para eliminar oxígeno singlete e interferir con las reacciones redox que

implican hierro y otros iones metálicos.

Se ha mostrado que la carnosina mejora las velocidades de la curación de heridas cuando se da como parte de una fórmula entérica completa, pero no se ha publicado hasta la fecha que se use tópicamente en preparaciones de curación de heridas.

- 5 Los CRCs tales como el profármaco de carnosina N-acetil-L-carnosina (NAC) sufren hidrólisis dando carnosina in situ. Se ha mostrado que la NAC trata el estrés oxidativo en trastornos oculares tales como cataratas y glaucoma.

Otros homólogos de la carnosina incluyen la homocarnosina y la anserina que protegen Cu,Zn-SOD de la inactivación y previenen el desprendimiento de Cu^{2+} . Se producen muchos homólogos de carnosina por la enzima carnosina sintetasa.

- 10 Los homólogos funcionales, derivados y profármacos de la carnosina que se pueden incorporar en composiciones según la invención incluyen uno o más de β -alanilhistamina (carcinina), N-acetil- β -alanilhistamina (N-acetil-carcinina), L-prolilhistamina, y/o N-acetil-L-carnosina.

La descarboxilación de L-carnosina proporciona un derivado con resistencia incrementada a las enzimas hidrolíticas. Se conocen peptidomiméticos de la carnosina (homólogos funcionales), que tienen propiedades de eliminación de radicales libres y de desactivación de hidroperóxido de lípido similares o incluso mejores que el péptido de carnosina natural.

- 15

Dos peptidomiméticos (homólogos funcionales) de carnosina N-acetil- β -alanilhistamina y L-prolilhistamina son inhibidores muy efectivos de la reticulación mediada por hidroperóxido de lípido de una proteína. In vivo, se ha mostrado que N-acetil- β -alanilhistamina protege la enzimas de la piel de la degradación inducida por UV.

- 20 Una composición ejemplar comprende uno o más antioxidantes, preferentemente seleccionados del grupo que comprende: arginina, ácido ascórbico, un profármaco o derivado de ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, fosfato de ascorbilo y magnesio, fosfato de ascorbilo y trisodio, anserina, carnosina, opidina, homocarnosina y/o acetilanserina. Generalmente, el o cada oxidante está presente de alrededor de 0,5 a 5%, preferentemente de alrededor de 1 a 3% peso/peso de la composición.

- 25 La arginina es un poderoso antioxidante y una diana de sacrificio muy efectiva para las reacciones de reticulación de proteína del tipo Maillard. Se ha mostrado que tanto la arginina como la lisina son inhibidores efectivos de la glicación, pero la arginina especialmente tiende a formar AGEs ella misma. Se sabe que el número y diámetro de los bucles capilares cerca de la unión dermis-epidermis (DEJ) se reduce con la edad. El suministro de nutrientes y la retirada de subproductos del metabolismo y otros procesos celulares está consecuentemente dañado. La L-arginina actúa como un vasodilatador debido a la formación catalizada por enzimas de óxido nítrico (NO) in situ. La formación de óxido nítrico (NO) de L-arginina se reconoce ahora como un camino bioquímico ubicuo implicado en la regulación de los sistemas cardiovascular, nervioso central y periférico, así como en otros mecanismos homeostáticos.

- 30 El ácido ascórbico (vitamina C, AA) es un nutriente esencial implicado en muchas funciones fisiológicas. Sufre fácilmente (aunque irreversiblemente) dos procesos de oxidación de un electrón consecutivos para formar el radical ascorbato, un radical libre relativamente no reactivo, y se le considera por lo tanto un excelente agente reductor. En los organismos vivos, el ácido ascórbico puede proteger los tejidos y las células del daño oxidativo de los radicales libres y de especies reactivas derivadas de oxígeno. Se sabe que el AA ejerce una fuerte capacidad protectora de los UVA en estudios en proteínas del cristalino que incluyen irradiación con rayos X.

- 35 Desgraciadamente, en algunas situaciones, el ácido ascórbico en disolución puede sufrir oxidación y producir ácido deshidro-L-ascórbico así como muchos productos de degradación, que pueden dar como resultado el oscurecimiento de composiciones que contienen ácido ascórbico. Varios factores pueden acelerar la degradación del ácido ascórbico tales como altas temperaturas de almacenamiento, luz, altos valores de pH y la presencia de oxígeno disuelto, aunque el mecanismo de reacción del ácido ascórbico con oxígeno no ha sido todavía completamente elucidado. Además, la reacción del ácido ascórbico con oxígeno es fuertemente catalizada por iones metálicos, particularmente iones cúprico y férrico. Para evitar la degradación, el componente ácido ascórbico de una composición se puede proporcionar separadamente y mezclar con los otros componentes de la composición poco antes del uso. Se puede incluir en la composición un profármaco o derivado de ácido ascórbico estable como alternativa, o además de ácido ascórbico.

- 40 El palmitato de ascorbilo es un derivado soluble en grasas de vitamina C muy usado en productos de cuidado de la piel. No es irritante y es más estable que el ácido ascórbico. Además, el palmitato de ascorbilo es un antioxidante soluble en grasas y es por lo menos tan efectivo como la vitamina E para proteger la piel de la peroxidación de lípidos (un tipo clave de daño por radicales libres en la piel).

- 45 El fosfato de ascorbilo y magnesio es un derivado soluble en agua de vitamina C. Es no irritante y más estable que la vitamina C. Lo más importante, el fosfato de ascorbilo y magnesio parece tener el mismo potencial que la vitamina C para incrementar la síntesis de colágeno de la piel pero es efectivo a significativamente bajas concentraciones. La

- 55

mayoría de las fórmulas de vitamina C son muy ácidas y por lo tanto producen exfoliación, de modo que el fosfato de ascorbilo y magnesio es un derivado de ácido ascórbico preferido para su uso en composiciones, particularmente aquellas para individuos con piel sensible y aquellos que desean evitar los efectos exfoliantes.

5 El fosfato de ascorbilo trisodio (Stay-C® 50) es la sal de sodio del éster de monofosfato de ácido ascórbico. Es una provitamina, con mayor estabilidad en disolución acuosa que el ácido ascórbico. Las fosfatasa en la piel actúan sobre el fosfato de ascorbilo trisodio para desprender ácido ascórbico.

10 Las composiciones ejemplares pueden contener una o más sustancias capaces de inducir la expresión de un chaperón molecular, particularmente útiles son las sustancias capaces de inducir la expresión de una proteína de choque térmico, clusterina y/o alfa-cristalina. La una o más sustancias capaces de inducir la expresión de un chaperón molecular pueden ser ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, iones cinc, una sal de cinc, sulfato de cinc, y/o cinc-L-carnosina. Usualmente, un agente que contiene cinc está presente de alrededor de 0,1 a 1%, preferentemente de alrededor de 0,25 a 0,75%, lo más preferentemente alrededor de 0,5% peso/peso de la composición. Cuando están presentes en la composición ácido acetilsalicílico y ácido salicílico una concentración apropiada es de alrededor de 0,5 a 2,5%, preferentemente de alrededor de 1 a 1,5% peso/peso de la composición.

15 Una composición según la invención puede comprender adicionalmente una o más sustancias antiapoptóticas, preferentemente seleccionadas del grupo que comprende nicotinamida, L-carnitina, acetil-L-carnitina, N-acetilcisteína y/l L-carnosina. La o una sustancia antiapoptótica está usualmente presente en una concentración de alrededor de 0,5 a 5%, preferentemente de 1 a 3% de la composición.

20 Se describe incluso más adicionalmente una composición que comprende una o más sustancias capaces de inducir la expresión de un chaperón molecular y un excipiente dermatológicamente aceptable.

Una composición ejemplar puede comprender adicionalmente uno o más ingredientes seleccionados del grupo que comprende una o más vitaminas, uno o más pequeños péptidos, y/o uno o más aminoácidos o uno de sus derivados o profármacos.

25 Las vitaminas que se pueden incorporar en las composiciones de la invención incluyen compuestos de vitamina B tales como tiamina (vitamina B1), por ejemplo, como pirofosfato de tiamina, tales como benfotiamina; piridoxamina (vitamina B6), vitamina A y/o E, o uno de sus derivados o profármacos.

30 Se ha mostrado que la piridoxamina (B6) inhibe efectivamente AGE y la formación de producto de lipoxidación, y en particular la formación de bloques de dímero de metilglioxal-lisina formando por sí misma dímero de metilglioxal-piridoxamina. La piridoxamina (B6) y el pirofosfato de tiamina (B1) han mostrado ambas que son efectivos inhibidores post-Amadori de la formación de AGE, efectuando B6 una disminución medible de la velocidad de formación de AGE y niveles finales de AGE y efectuando B1 una disminución medible solo de los niveles finales de AGE. Ambos compuestos muestran mucho mayor potencia en la inhibición post-Amadori de la formación de AGE que la amidoguanidina. Los derivados de tiamina tales como benfotiamina (profármaco soluble en lípido de tiamina) han sido identificados como potenciales agentes terapéuticos en la inhibición de la glicación intracelular en el tratamiento de complicaciones diabéticas vasculares y se ha mostrado que inhiben la acumulación de AGE del tipo de imidazolona.

35 La composición puede comprender uno o más pequeños péptidos apropiadamente en forma de dipéptido, tripéptido y/o tetrapéptido, y/o uno o más aminoácidos, por ejemplo, prolina, lisina, histidina, alanina, o uno de sus derivados o profármacos.

40 Una composición ejemplar puede comprender adicionalmente uno o más polisacáridos, que pueden ser uno o más proteoglicanos, tales como glicosaminoglicano.

El uno o más glicosaminoglicano empleado puede ser un hialuronano de bajo y/o alto peso molecular, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y/o uno o más de sus derivados.

45 Además de la necesidad de desglicar las proteínas de la matriz e incrementar la función vascular de la dermis, un efecto importante de tales composiciones es el restablecimiento del contenido y distribución de proteoglicano. Los proteoglicanos (PGs) son importantes para proporcionar la "suave" turgencia de la piel debida a la hidratación y son también importantes como reservorios intercelulares de factores de crecimiento y otras citoquinas. Los PGs se sintetizan por los fibroblastos dérmicos y tienen una cercana relación con los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblasto básico (b-FGT). El dominio de unión N-terminal del colágeno es afectado por la glicación y consecuentemente la cantidad y localización de PGs en la dermis son afectadas por la acumulación de AGE. Por ejemplo, los proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPGs) promueven la proliferación celular por medio de interacciones con FGF-2.

50 Se ha mostrado que algunos GAGs, especialmente el ácido hialurónico, están cada vez menos presentes en la piel envejecida. Aunque los mucopolisacáridos solo constituyen el 0,1-0,3% del peso seco de la piel, se puede entender fácilmente que cualquier disminución influya en la turgencia de la piel dado que las moléculas unen agua en la

55

dermis hasta 1000 veces el volumen de la molécula misma. Adicionalmente, se sabe que estas sustancias influyen en la migración, crecimiento y diferenciación de las células del tejido conjuntivo en algunos casos.

5 El ácido hialurónico o hialuronano ("HA") es un polisacárido de cadena larga que es un constituyente principal que rodea las células en la mayoría de los tejidos animales. El HA es atraído y se adhiere a receptores específicos o membranas celulares que se pueden encontrar en números crecientes en sitios de daño y enfermedades en el cuerpo en una cantidad significativa sobre la piel. Esto quiere decir que los fármacos pueden potencialmente ser dirigidos hacia y mantenidos en el sitio en el que se necesite el fármaco. El perfil de seguridad de HA, su capacidad para llevar fármaco y sus potenciales características de marcador lo convierten en un vehículo excelente para suministro tópico de fármaco. Los fármacos se pueden unir covalentemente a HA o estar contenidos dentro de las redes reticuladas de derivados de HA.

10 Se ha usado hialuronano durante décadas en cosméticos, viscoscirugía y viscosuplementación sin reacciones inmunes o cualquier otro efecto secundario. Está presente naturalmente a altas concentraciones en tejidos conjuntivos tales como piel y cartílago, en el cuerpo vítreo del ojo y en el fluido sinovial. Generalmente está unido a células y proteínas pero algo de HA está presente en el fluido intersticial. El HA es un polisacárido que consiste en unidades alternas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. Los grupos carboxilo presentes están en gran parte ionizados al pH de la piel (generalmente alrededor de pH 4,5 a 5,5) y es por lo tanto muy hidrófila. Las propiedades de unión a agua y el tamaño molecular polimérico de HA predisponen el HA a formar geles viscoelásticos que tienen potencial para la retención superficial, actuando como reservorio para agentes terapéuticos. A pesar de las propiedades hidrófilas del HA, puede penetrar la epidermis normal y acumularse extracelularmente en la dermis antes de su eliminación vía caminos metabólicos conocidos.

15 En ejemplos preferidos, una composición comprenderá un hialuronano de bajo y alto peso molecular y/o uno o más de sus derivados. El hialuronano de bajo peso molecular tiene característicamente un peso molecular de menos de 1×10^6 Da, mientras que un hialuronano de alto peso molecular generalmente tiene un peso molecular mayor de 1×10^6 Da.

20 El HA forma una película lubricante suave viscoelástica cuando se aplica a la superficie de la piel, de este modo el HA externamente aplicado no solo tiene un efecto beneficioso sobre la piel, sino que también se puede usar para mejorar la viscosidad de una composición de modo que en la aplicación a la piel permanece en contacto con la piel en una capa del tipo de gel. Esto es particularmente beneficioso cuando se va a aplicar ultrasonido a piel tratada con una composición según la invención.

25 La molécula de HA se puede derivar vía modificación del acetamido, el grupo terminal reductor pero lo más comúnmente los grupos hidroxilo y carboxilato. La unión glicosídica también se hidroliza fácilmente para crear cadenas más cortas u oligosacáridos. Se han sintetizado aductos HA-fármaco para aplicaciones de suministro controlado y aductos HA-proteína como biomateriales y substratos celulares.

30 El HA existe como Na-HA a pH fisiológico. Tiene una carencia completa de inmunogenicidad que lo hace un bloque de construcción ideal para biomateriales y sistemas de suministro de fármacos. El HA efectúa un desprendimiento controlado y sostenido de fármacos a través de la piel por la formación de un reservorio del fármaco alrededor de la membrana basal. Ni el NaCMC (con un peso o concentración reológicamente equivalente) ni el sulfato de condroitina (a una concentración equivalente en peso) ejercen el efecto de desprendimiento controlado visto para la formulación de hialuronano en todo el grosor de la piel, de este modo el HA un glucosaminoglicano particularmente preferido.

35 Se cree que la mejora de la absorción percutánea por HA es parcialmente debida a su capacidad de hidratar la piel rompiendo de este modo las compactas capas célula/lípido. El HA es superior a otros GAGs en este aspecto debido a su alta capacidad de unión a agua.

40 Se ha encontrado que los tetrasacáridos de HA ejercen un efecto anti-apoptótico ya que aumentan la expresión de HSP72 en condiciones de estrés y suprimen la muerte celular. Los polisacáridos HA de alto peso molecular son generalmente moléculas que llenan espacio con actividad antiangiogénica, antiinflamatoria e inmunosupresora. Los fragmentos de más bajo peso molecular (6-20 kDa) son angiogénicos, inflamatorios e inmunoestimulantes.

45 Se ha mostrado que el HA se despolimeriza por productos de la reacción de Maillard (glucosa-lisina) vía un mecanismo de radicales libres. Los radicales hidroxilo despolimerizan HA y han sido relacionados con la inflamación en artritis y la degradación del fluido sinovial. El HA de alto (pero no bajo) peso molecular y los derivados de tal HA tales como BEHA actúan como antioxidantes eliminando especies de oxígeno reactivo (ROS) tales como O_2 y OH, que si no dañarían las propiedades migratorias y proliferativas de los fibroblastos dérmicos prolongando por ello la inflamación y retrasando la curación de las heridas.

50 Los hialuronanos tienen la capacidad de incrementar la síntesis de proteoglicano, estimular el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1, tiene la capacidad de estimular la remodelación de colágeno, para mejorar la migración celular, estimula la curación de heridas aumentando la expresión del factor- β de crecimiento de transformación.

El HA de bajo peso molecular (~300 kDa) está disponible de Sigma, Poole, Dorset (aislado de humor vítreo bobino). El HA de alto peso molecular está disponible de ConvaTec, Flintshire, UK (aislado de cordón umbilical humano) Las preparaciones de HA comercialmente disponibles se dan en las tablas 1a, 1b y 1c.

Tabla 1a. Ejemplos de NaHA usado en tratamiento clínico de osteoartritis

Nombre comercial	Peso molecular de NaHA*	Fabricante
Artz®	600.000-1.200.000	Seikagaku (Japón)
Hyalgan®	500.000-730.000	Fidia (Italia)
Synvisc®	HA ligeramente reticulado	Biomatrix (EE.UU.)

5

Tabla 1b. Ejemplos de NaH usado en cirugía oftalmológica

Nombre comercial	Peso molecular de NaHA*	Fabricante
Opegan®	600.000-1.200.000	Seikagaku (Japón)
OpeganHi®	1.900.000-3.900.000	Seikagaku (Japón)
Healon®	1.900.000-3.900.000	Pharmacia-Upjohn (Suecia)
Opelead®	1.530.000-2.130.000	Shiseido (Japón)

* Peso molecular de ingrediente activo

Otros Has incluyen NIF-NaHA comercializado con el nombre Healon® para uso médico y Hylartil® para uso veterinario; Hylan A (fluido elastoviscoso) e Hylan B (gel viscoelástico) desarrollado por Biomatrix Inc.

10 Tabla 1c

Nombre comercial (fabricante)	Nombre Genérico	Peso molecular (x 10 ⁶ Da)	Elasticidad (%) a 3 Hz	Viscosidad del complejo (Pas a 0,02 Hz)	Concentración de polisacárido (mg/ml)
Hyalgan® (Fidia)	Hialuronano	0,5-0,65	26	<0,1	10
Artz® (Seikagaku)	Hialuronano	0,75	33	0,3	10
Orthovisc® (Anika)	Hialuronano	1,5	66	42	15
Synvisc® Biomatrix	Hylan	6	88	213	8
SkyePharma (Gel Solareze diclofenac)		0,6			

15

Un excipiente o excipientes dermatológicamente aceptables apropiados para su uso en una composición ejemplar incluyen agua, una mezcla etanol/agua (por ejemplo, hasta 25%, preferentemente hasta 20% de etanol en la composición % peso/peso), un gel o emulsión viscosa, un gel acuoso, un hidrogel, una emulsión basada en agua en la forma de una crema o aplicación, una emulsión de aceite en agua en la forma de una crema o una aplicación, o una gelatina.

Generalmente, una composición que se va a aplicar junto con tratamiento de ultrasonido (en la que la composición

se aplica previamente, durante el tratamiento de ultrasonido, o poco después de un pretratamiento de ultrasonido) tendrá una naturaleza viscosa, de modo que se puede extender una capa de la composición sobre la piel y permanecerá en su lugar sobre la piel hasta que sea retirada, por ejemplo, limpiando la composición con papel tisú o lana de algodón, o lavando la formulación.

- 5 Una composición ejemplar puede comprender un ingrediente que forma película. Pueden estar incluidos en tal composición uno o más ingredientes seleccionados de: un protector solar, humectante, pigmento, pigmento base o corrector cosmético, pigmento o composición autobronceadora.

Tal composición está preferentemente a un pH cercano al pH de la piel, por ejemplo, a un pH de pH 4 a pH 6, o de pH 4,5 a pH 5,5.

- 10 También se describe un método para el tratamiento de la piel, que comprende aplicar a la piel una composición como se describe anteriormente.

Preferentemente el método es un método de tratamiento cosmético de problemas cosméticos de la piel. Sin embargo el método incluye también el tratamiento de problemas médicos de la piel, en cuyos casos el método es un método de tratamiento médico.

- 15 Un método para el tratamiento de la piel puede comprender adicionalmente la aplicación de ultrasonido directa o indirectamente a un área de piel a la que se ha aplicado la composición, o como un pretratamiento a un área de piel a la que se va a aplicar la composición.

En métodos preferidos de la invención se realiza la aplicación de ultrasonido de baja y/o alta frecuencia, directa o indirectamente a un área de la piel en la que se ha aplicado o se va a aplicar la composición.

- 20 El ultrasonido de baja y alta frecuencia se puede aplicar simultánea, secuencial o separadamente, por ejemplo, secuencialmente en forma de varias aplicaciones individuales alternas de baja y alta frecuencia o, separadamente en la que una serie de aplicaciones de baja frecuencia se alterna con una serie de aplicaciones de alta frecuencia.

- 25 Se cree que el ultrasonido de baja frecuencia es útil para facilitar el suministro de moléculas a la piel (un proceso denominado "sonoforesis"). El ultrasonido de alta frecuencia tiene un menor efecto sonoforético que el de baja frecuencia, pero tiene también otros efectos beneficiosos para la piel porque estimula la proliferación de fibroblastos, estimula la formación de colágeno y otro componente de la matriz extracelular (ECM) (por ejemplo, fibrilina), estimula el suministro de sangre, renueva la calidad elástica del ECM que se rigidiza con la edad, estimula la expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs – chaperones moleculares intracelulares) en fibroblastos (dermis) y queratinocitos (epidermis) por medio de la estimulación térmica y mecánica.

- 30 En un método preferido, se aplica simultáneamente ultrasonido de baja y alta frecuencia.

En métodos de la invención que implican la aplicación de ultrasonido de baja y alta frecuencia, el componente de baja frecuencia del ultrasonido se aplica preferentemente de modo continuo y el componente de alta frecuencia se aplica frecuentemente de modo pulsado.

- 35 El término "ultrasonido" describe frecuencias de sonido de 20 kHz y mayores, un ultrasonido de baja frecuencia es de 20 a 500 kHz, siendo la densidad de potencia media espacial de ultrasonido de baja frecuencia de 20 a 500 mW/cm²; un ultrasonido de alta frecuencia es de 500 kHz (0,5 MHz) a 3,5 MHz, siendo la densidad de potencia media espacial del ultrasonido de alta frecuencia de 0,5 a 3 W/cm².

- 40 En los métodos ejemplares generalmente el haz no está enfocado y es divergente. La elevación de temperatura de la diana es hasta 42 o 43°C, pero preferentemente no más alta. Ciertas áreas de la piel son insonadas durante un mínimo de 5 minutos, preferentemente 10 minutos, o un tiempo entre 5 y 12 minutos.

- 45 En métodos ejemplares, se puede aplicar ultrasonido usando un aplicador manual, opcionalmente adaptado para la aplicación de una composición como se describe anteriormente a la piel. Por ejemplo, se puede unir un cartucho/dispensador a la cabeza de ultrasonido tal que la formulación se desprende gradualmente a medida que se mueve la cabeza alrededor de la superficie de la piel, el cartucho puede contener una cantidad de formulación predeterminada. Se pueden unir diferentes cartuchos con diferentes formulaciones dependiendo del problema de la piel que se está tratando, por ejemplo, diferentes cartuchos pueden contener diferentes composiciones para tratamientos antienvjecimiento, tratamiento de cicatrices, piel estirada-marcada o celulitis. El ultrasonido se aplica masajeando suavemente el aplicador de ultrasonido sobre la piel con un movimiento suave circular o lineal.

- 50 Se puede aplicar ultrasonido como pretratamiento antes de la aplicación de una composición de la invención. Alternativa o adicionalmente, se puede aplicar a la piel una capa de la composición o un material impregnado con la composición durante o previamente a la aplicación de ultrasonido. Cuando se usa un aplicador, el aplicador se mueve por la piel de modo que ni un solo área está sobreexpuesta al ultrasonido, lo que provocaría sobrecalentamiento. La combinación de ultrasonido y estímulo mecánico proporcionada por la acción masajeadora ayuda a estimular la piel para estimular la renovación y reparación.

El ultrasonido se puede aplicar por inmersión del área que se va a tratar en un baño de ultrasonido, por ejemplo, directamente por inmersión de la piel desnuda en una composición de la invención, o revistiendo la piel con la composición, envolviendo la parte a tratar, y sumergiéndola en un líquido que pueda transmitir la energía del ultrasonido.

5 Como se describe anteriormente, un aparato para la aplicación de ultrasonido a la piel puede comprender una pluralidad de elementos transductores de ultrasonido dispuestos en forma de un conjunto en un material flexible en configuración espaciada, en el que los elementos transductores de ultrasonido son capaces de suministrar ultrasonido a baja y/o alta frecuencia a un área de la piel.

10 El tratamiento de la piel usando este método se puede realizar en una clínica de belleza o en una clínica médica tal como un hospital clínico, o un consultorio.

Un área circular de piel de 2 a 3 cm de diámetro debe ser sometida a ultrasonido durante un mínimo de 5 minutos, preferentemente 10 minutos o un tiempo entre 5 y 12 minutos.

15 Cuando los tratamientos de la piel se van a llevar a cabo en una clínica de belleza o una clínica médica tal como un hospital o un consultorio, un dispositivo de ultrasonido apropiado para uso en tales métodos es un conjunto de ultrasonido incorporado en una máscara o parche como se describe aquí; o un dispositivo que puede generar producciones de baja y alta frecuencia y tiene un mando diseñado para dar combinaciones de frecuencias y energías de salida, tal como la unidad Duo Son™ (Orthosonics, Devon UK). La unidad Duo Son™ se puede usar con la actual especificación (descrita en la tabla 2), o con una especificación ligeramente alterada dictada por la optimización de la frecuencia, vataje y parámetros del ciclo de trabajo para mejorar el suministro de activos y la estimulación de células/proteínas. Tales ajustes permanecen dentro de las directrices que marca la CE de la unidad.

20 La efectividad del ultrasonido (US), o sonoforesis para suministro de moléculas a la piel, es debida a dos aspectos de su acción sobre la piel. Primeramente, la cavitación es el resultado del campo de presión rápidamente oscilante que provoca la formación y colapso de burbujas que crea mecánicamente canales a través del stratum corneum. El segundo efecto es el calentamiento directo real del material a través del que están viajando las ondas del sonido debido a la atenuación de la energía acústica por reflexión, absorción y dispersión. Esto ocurre en la piel hasta cuatro veces más que en otros tejidos debido a su heterogeneidad. Se sabe que el calor rompe el sistema de bicapa de lípido en el stratum corneum contribuyendo también a la permeabilidad mejorada de la epidermis.

Tabla 2

Fuente de alimentación		
Entrada	C.A. de 90 V-260 V (50/60 Hz)	
Salida	C.C. de 24 V, 1,25 A	
Duración de la batería	De 15 minutos a 2 horas dependiendo del modo de selección	
Otros		
Modos	LF solo, LF+HF (pulsado)	
Peso	2 kg	
Dimensiones	(200 x 250 x 70 mm) (a x p x alt)	
Clase	BF	
Monitor	Monitor de cristal líquido	
Estándar	IEC 61689 (96)	
	Baja frecuencia 45 kHz	Alta frecuencia 1 MHz
Área efectiva del haz radiante	16,3 cm ²	0,38 cm ²
Relación de no uniformidad de haz	<6	<6
Tipo de haz	Divergente	Divergente
Niveles de potencia	0,15 W, 0,4 W, 0,75 W	0,07 W, 0,14 W

Intensidad máxima	100 mW/cm ²	1 W/cm ² (420 mW/cm ² pulso promediado)
Modo de funcionamiento	Continuo	Pulsado el 20% del ciclo de trabajo

- 5 Esencialmente se incrementa la permeabilidad de la piel por rotura de los lípidos intercelulares por una combinación de calentamiento y/o estrés mecánico y por el incremento de porosidad. Se han publicado elevaciones de la temperatura hasta 50°C (20 kHz, 10-30 W/cm²), pero se ha mostrado que elevaciones tan pequeñas como 11°C (1 MHz, 2 W/cm²) provocan daño a la piel. El ultrasonido en modo continuo a una intensidad de 1 W/cm² eleva la temperatura del tejido hasta una profundidad de 3 cm hasta 40°C en 10 minutos. Se ha sugerido que el tejido debe llegar a una temperatura de 40-45°C durante por lo menos 5 minutos para que sea terapéuticamente beneficioso. Se ha mostrado que las temperaturas del tejido se incrementan a una velocidad de 0,86°C/min cuando se expone a ultrasonido de 1 W/cm² – 1MHz.
- 10 Se sabe que el ultrasonido actúa para degradar polímeros y se ha usado para incrementar el desprendimiento de fármacos incorporados de estos polímeros. Cuando se aplica ultrasonido a composiciones de la invención que comprenden polímeros tales como polisacáridos, preferentemente proteoglicanos, en particular glucosaminoglicanos, tales como HA, el ultrasonido degradará (despolimerizará) el polímero. Esto tiene varios efectos, cuando está presente HA en la composición, el ultrasonido genera polímeros de HA de cadena más corta que son capaces de penetrar más fácilmente en la piel, además de emplear ultrasonido para facilitar la permeación de sustancias activas, es importante que se maximice el tiempo de residencia efectiva de tales compuestos activos en el sitio de acción. La microvasculación permite que se retiren las sustancias del sitio de permeación para su descomposición en el hígado. La optimización del tiempo de residencia es necesaria para permitir que la sustancia activa tenga el efecto deseado. Cuando una composición ejemplar comprende polímeros tales como polisacáridos o proteoglicanos, en particular glucosaminoglicanos, tales como HA, el tratamiento de ultrasonidos ayudará a la formación de un depósito del polímero (por ejemplo, HA) dentro de la piel que puede actuar como reservorio para el desprendimiento lento de compuestos activos proporcionando una duración extendida del efecto.
- 15
- 20
- 25 El ultrasonido también estimula la liberación de los ingredientes activos de la composición. El ultrasonido actuará también para despolimerizar polímeros polisacáridos o proteoglicanos, en particular glucosaminoglicanos, tales como HA que han penetrado en la piel. Cuando HA y ácido ascórbico están presentes en una composición, la despolimerización del HA será estimulada por ácido ascórbico en el que reaccionará con oxígeno atmosférico y estimulará la despolimerización.
- 30 Una composición ejemplar se puede aplicar junto con ultrasonido, pero esto no es esencial, tal composición se aplicará también a la piel sin la aplicación de ultrasonido. En un método preferido para el tratamiento de la piel, se aplica una primera composición ejemplar junto con ultrasonido (con un pretratamiento de ultrasonido de la piel a la que se aplica la composición, o con tratamiento de ultrasonido de la piel durante o después de la aplicación de la composición a la piel) semanalmente, por quincenas o mensualmente. Después del tratamiento de ultrasonido de la piel, se puede aplicar una segunda composición ejemplar, por ejemplo, diariamente o cada doce horas sin la necesidad de ultrasonido. La primera y segunda composición pueden ser idénticas o diferir en composición.
- 35 Se describe adicionalmente una venda que comprende una composición ejemplar como se discute anteriormente, que se puede presentar en la forma de un emplaste, parche, venda de parche de gel o espuma.
- 40 También se describe un kit que comprende una composición ejemplar y opcionalmente un dispositivo que comprende una fuente de ultrasonido y/o opcionalmente un aplicador para aplicar ultrasonido a la piel y/o para aplicar la composición a la piel. Tal kit es apropiado para realizar un método ejemplar como se describe aquí. Un kit puede comprender adicionalmente instrucciones para uso del kit.
- 45 Se describe también el uso de una composición ejemplar en el tratamiento de un problema cosmético de la piel. También se describe el uso de una composición tal en la fabricación de una composición cosmética para el tratamiento de un problema cosmético de la piel, por ejemplo, seleccionado del grupo de: cicatrices, piel dañada por el sol, piel envejecida, arrugas, rugosidad, pigmentación irregular, telangiectasias, elastosis, celulitis, aspecto de piel de naranja de la piel; problema de piel seca, descamación, acné, estrías; erupciones, aspereza y tirantez, piel inflamada; manchas, rosácea, cicatrices de acné de tipo "picahielo", cicatrices hipertróficas y queloides, y pérdida de pelo.
- 50 La expresión "problemas cosméticos de la piel", tal como se usa aquí, incluye signos de envejecimiento de la piel que incluyen, pero no están limitados a, todas las manifestaciones externas visible y táctilmente detectables así como cualquier otro macro- o micro-efecto debido al envejecimiento de la piel. Tales signos pueden ser inducidos o causados por factores intrínsecos o extrínsecos, por ejemplo, envejecimiento cronológico y/o daño medioambiental (por ejemplo, luz solar, UV, humo, ozono, contaminantes, estrés, etc.). Estos signos pueden ser el resultado de procedimientos que incluyen, pero no están limitados a, el desarrollo de discontinuidades de textura tales como arrugas, que incluyen tanto arrugas superficiales finas como arrugas profundas gruesas, líneas de la piel, líneas de

ceño fruncido , líneas de expresión, arrugas, dermatoheliosis, fotolesiones, envejecimiento prematuro de la piel, grietas, bultos, picaduras, grandes poros (por ejemplo, asociados a estructuras anexiales, tales como conductos de glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, o folículos pilosos), aspecto de la piel de “piel de naranja”, sequedad, descamación, caspa y/u otras formas de irregularidades o rugosidades de la piel; problemas de exceso de grasa en la piel tales como la sobreproducción de sebo, aceitosidad, brillo facial, ruptura de la base; descamación (o exfoliación) anormal o diferenciación epidérmica anormal (por ejemplo, producción anormal de piel) tal como descamación, caspa, queratosis, hiperqueratinización; humedecimiento (o hidratación) inadecuado de la piel tal como la causada por el daño a la barrera de la piel, sequedad medioambiental; pérdida de la elasticidad de la piel (pérdida y/o inactivación de la elastina funcional de la piel) tal como elastosis, flacidez (incluyendo enbolsamiento en el área del ojo y papada), pérdida de la firmeza de la piel, pérdida de la tersura de la piel, pérdida de la recuperación de la piel después de la deformación; decoloración de la piel no de melanina tal como círculos bajo el ojo, embotamiento (por ejemplo, coloración roja desigual debida, por ejemplo, a rosácea), amarillez (color pálido), decoloración causada por telangiectasia; regiones de la piel hiperpigmentadas (o irregularmente pigmentadas) relacionada con la melanina; hiperpigmentación post-inflamatoria tal como aquella que ocurre después de un suceso inflamatorio (por ejemplo, una lesión de acné, pelo crecido hacia adentro, mordisco o picadura de insecto/araña, arañazo, corte, herida, abrasión, y similares); atrofia tal como, pero no limitada a, aquella asociada a envejecimiento o uso de esteroides; otras alteraciones histológicas o microscópicas de los componentes de la piel tales como sustancia base (por ejemplo, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos, etc.), degradación de colágeno y alteraciones estructurales o anomalías (por ejemplo, cambios en el stratum corneum, dermis, epidermis, el sistema vascular de la piel tal como telangiectasia); respuestas tisulares a agresión tal como picor o prurito; y alteraciones de los tejidos subyacentes (por ejemplo, grasa subcutánea, celulitis, músculos, trabeculae, septae, y similares), especialmente aquellas próximas a la piel.

Se describe también el uso de una composición ejemplar en un tratamiento médico o en forma de un medicamento. De este modo se describe una composición para uso como medicamento. Se describe adicionalmente el uso de tal composición en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un problema médico de la piel, por ejemplo, seleccionado del grupo: cicatrización, quemadura de sol, heridas, cortes, rasguños, quemaduras, cicatriz de quemadura, eczema, dermatitis, problemas de piel seca, urticaria, psoriasis.

Lista de Figuras

La Figura 1 (a) – (c) muestra un conjunto de elementos transductores; la figura 1(d) muestra un elemento transductor individual con capacidad de frecuencia dual.

La Figura 2 (a)-(b) muestra un elemento transductor.

La Figura 3A muestra un solo chip DDS para la generación de frecuencias alta y baja alternativas, mientras que en la figura 3B se generan bajas frecuencias en circuitos individuales. La Figura 4 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de fibrilina próxima a la unión dermis-epidermis.

La figura 5 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de MMP-1 en la epidermis.

La figura 6 muestra la formulación de Tópico 1 en la expresión de RAR α en la epidermis.

La figura 7 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de HSP72 en la epidermis.

La figura 8 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de fibrilina próxima a la unión dermis-epidermis después del tratamiento de ultrasonido.

La figura 9 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de MMP-1 epidérmica después del tratamiento de ultrasonido.

La figura 10 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de MMP-1 epidérmica después del tratamiento de ultrasonido.

La figura 11 muestra el efecto de la formulación de Tópico 1 en la expresión de la clusterina epidérmica después del tratamiento de ultrasonido.

Ejemplos

Ejemplo 1 – formulación tópica “Tópico 1”

Tópico 1 es una composición ejemplar que contiene los siguientes componentes:

Tabla 3

Componente	Cantidad. % peso/peso
Ácido hialurónico (intervalo de 0,8-3 MDa de peso molecular)	1%
Ácido hialurónico (intervalo de 1,5-1,8 MDa de peso molecular)	3%
Etanol	20%
Ácido ascórbico	3%
Fosfato de ascorbilo trisódico	1%
Carnosina	3%
N-acetilcarnosina	1%
Arginina	3%
Agua destilada estéril	Hasta 100%

Ejemplo 2. Ensayos de parche

- 5 El ensayo estándar de un parche de cuatro días se extendió hasta un periodo de siete días para examinar el efecto de la formulación de Tópico 1 bajo oclusión o suministrada por ultrasonido sobre la inducción de la expresión de fibrilina como mecanismo por el que se pueden mejorar las señales clínicas del fotoenvejecimiento.
- A sujetos con evidencia clínica de fotoenvejecimiento de la piel del antebrazo se les aplicaron los siguientes productos bajo oclusión al dorso del antebrazo:
- 10 (1) 0,025% de t-RA preparado en un vehículo que comprende 67,2% de etanol, 30% de propilenglicol y 0,05% de butilhidroxitolueno (conservante) hasta 100% con agua desionizada (control positivo),
- (2) vehículo solo como anteriormente,
- (3) formulación de Tópico 1.
- Se suministró formulación de Tópico 1 con y sin el uso de un dispositivo de ultrasonido.
- 15 El control positivo, aplicación tópica de 0,025% de RA todo-trans bajo oclusión se aplicó dentro del marco tiempo estándar de cuatro días para minimizar los efectos secundarios potencialmente perjudiciales.
- 20 La fibrilina es un constituyente principal de la red de elastina en la dermis papilar y juega un papel importante en asegurar la epidermis a la dermis subyacente. La aplicación tópica de ácido retinoico todo-trans (t-RA) como control positivo mejora los signos clínicos del fotoenvejecimiento. El trabajo previo ha demostrado que la aplicación tópica de t-RA bajo oclusión durante cuatro días (el ensayo del parche de cuatro días) produce un significativo incremento de mRNA de fibrilina y proteína, predictiva de aquellas vistas después de varias semanas de aplicación tópica no ocluida que proporciona un medio rápido y conveniente de evaluar la acción de nuevas intervenciones terapéuticas en la piel.
- 25 El envejecimiento se puede monitorizar también por examen de otras moléculas dentro de la piel. El trabajo previo ha identificado alteraciones en la expresión de la metaloproteínasa 1 de matriz enzimática (MMP-1; esencial para remodelar la matriz extracelular)³ y en el receptor retinoico nuclear α de ácido retinoico (RAR α ; necesario para modular los efectos de la vitamina A y sus derivados)⁴. Se evaluaron dos chaperones moleculares para identificar caminos para eliminar proteínas anormales; estas eran la proteína de choque térmico 72 (HSP72)⁵ y el chaperón extracelular, clusterina⁶.
- 30 El estudio era un estudio clínico abierto; la evaluación de biopsias era al azar y ciega. El estudio se llevó a cabo en 10 sujetos, de 40-80 años, que se juzgó que tenían la piel del antebrazo de moderada a severamente envejecida.
- Los criterios de inclusión aplicados fueron:
- 35 De 40 a 80 años; dispuestos a someter a examen la piel del antebrazo envejecida; dispuestos a llevar parches de ensayo sobre el antebrazo durante hasta 4 días; dispuestos a someterse a biopsias de 3 mm de punción de cada uno de los cuatro sitios de ensayo (un total de 4 biopsias); sin problema de enfermedad que afectara a la evaluación de los sitios de ensayo; sin tomar fármacos sistémicos; sin retinoides tópicos o sistémicos en los 6 pasados meses y

12 meses respectivamente previa a la entrada en el estudio; sin esteroides tópicos u otros fármacos tópicos dos semanas; informe de consentimiento firmado.

Los criterios de exclusión aplicados fueron:

- 5 Historial de uso de fármaco experimental o dispositivo experimental en los 30 días previos a la entrada al estudio; historial de cicatrices queloides; embarazo o lactancia materna.

El procedimiento del estudio implica la anotación del historial y un examen físico; graduación clínica de la severidad del fotoenvejecimiento del antebrazo extensor en una escala de 0 a 9 (0 = sin daño; 9 = máximo fotodaño); se obtiene un informe de consentimiento escrito certificado. Los sujetos admitidos en el estudio tienen fotodaño de grado 6 o mayor.

10 Materiales y métodos

Protocolo del ensayo del parche

- 15 Se reclutaron seis mujeres voluntarias sanas pero con fotoenvejecimiento (intervalo de edades 52-79 años). Se aplicaron sustancias de ensayo separadamente en cámaras Finn de 6 mm de diámetro estándar a la cara extensora del antebrazo; estas fueron la formulación de Tópico 1 (20 µl/cámara), vehículo base (20 µl/cámara) y 0,025% de RA todo-trans (crema Retin-A®, Janssen-Cilag Ltd., 20 µl/cámara). Además, se tomó una biopsia de referencia sin tratar como punto de referencia. Se aplicaron formulaciones a piel limpia los días 1 y 4 del ensayo. Se aplicó RA todo-trans a un sitio sin tratar el día 4. El día 8 se retiraron las cámaras Finn y se obtuvieron biopsias por punción de 3 mm con anestesia de lignocaína al 1% de cada uno de los sitios de ensayo. Las biopsias se empaparon en compuesto OTC (Tissue-Tek®, Miles, IN, USA) y se congelaron de golpe en nitrógeno líquido. Los 20 sitios de biopsia se suturaron con etilón 1x4/0 y se mandó volver a los sujetos entre 7-10 días para la retirada de la sutura.

Protocolo de ultrasonido

- 25 Se reclutaron diez voluntarios sanos pero fotoenvejecidos (hombres: 2; mujeres: 8; intervalo de edades 40-79 años). Se aplicó formulación de Tópico 1 a los extensores de los antebrazos sola y con la ayuda de un dispositivo de ultrasonido (unidad Duo Son™, Orthosonics, Devon UK). Se aplicaron simultáneamente baja frecuencia (45 kHz, 100 mW/cm², continua) y alta frecuencia (1 MHz, 1 W/cm² pulsada media, pulsada el 20% del ciclo) durante un periodo de diez minutos, tiempo durante el que la cabeza de suministro de ultrasonido se movió sobre la piel. El tratamiento ocurrió los días 1, 4 y 7 del ensayo. El día 8, se retiraron biopsias por punción de 3 mm de cada sitio de tratamiento como se describe previamente.

30 Preparación de muestras

Se prepararon secciones congeladas con un grosor de 10 µm (criostato OTF, Bright Instruments Ltd.) y se montaron en portamuestras revestidos de gelatina previamente al análisis histológico.

Inmunohistoquímica

- 35 Varias moléculas de la matriz extracelular (ECM) que se sabe que se reducen en la piel envejecida se analizaron por inmunohistoquímica para detallar los potenciales efectos de la formulación de Tópico 1 y su método de suministro. El marcador principal del resultado era la distribución de microfibrillas ricas en fibrilina próximas a la unión dermis-epidermis (DEJ). También se evaluaron el número de queratinocitos epidérmicos que expresan MMP-1 y RARα. Se examinaron los chaperones moleculares, HSP72 y clusterina para evaluar los potenciales mecanismos de reparación.

- 40 Para cada análisis, se identificó el marcador en cada una de las tres secciones (es decir, 3 secciones/tratamiento/paciente).

- 45 Las secciones se fijaron óptimamente. Después de la hidratación en disolución salina tamponada de Tris (TBS; Tris 100 mM, NaCl 150 mM), las secciones se solubilizaron por adición de 0,5% de Triton®-X 100 (10 minutos). Después de lavar, se suprimió la actividad de la peroxidasa endógena por incubación con un exceso de peróxido de hidrógeno en metanol (30 minutos). Las secciones se bloquearon previamente a la aplicación de anticuerpo primario (incubación durante la noche a 4°C). Los controles negativos se incubaron concurrentemente con bloque solo o con suero de ratón de control. Después de la incubación, las secciones se lavaron rigurosamente con TBS previamente a la aplicación de un apropiado anticuerpo secundario biotinilado. Esto se conjugó adicionalmente con la enzima peroxidasa de rábano usando un kit comercialmente disponible siguiendo las instrucciones del fabricante (ABC Elite System, Vector Laboratory, Peterborough UK). El anticuerpo se localizó usando Vector SG® como cromógeno (10 minutos de incubación, el lavado en TBS enfrió esta reacción. Las secciones se tiñeron con colorante de contraste usando Nuclear Fast Red y finalmente se deshidrataron con alcoholes en serie, se aclararon y se montaron permanentemente.

Tabla 4

Marcador	Portador	Clon	Fijación	Dilución
Microfibrillas ricas en fibrilina	IgG de ratón	NeoMarkers; 11C1.3	PFA al 4%	1:100
MMP-1	IgG de ratón	Oncogene; 41-1E5	PFA al 4%	1:100
RAR α	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnologies	Acetona	1:100
HSP72	IgG de ratón	Stressgen Biotechnologies	PFA al 4%	1:100
Clusterina	IgG de conejo	Santa Cruz Biotechnologies	PFA al 4%	1:100

Cuantificación

- 5 Las secciones se aleatorizaron, se ocultó su identidad y se examinaron en un microscopio Nixon OPTIPHOT (Tokyo, Japón). Para la evaluación de los componentes de la ECM, se evaluó el grado de inmunoteñido según una escala semicuantitativa de 5 puntos en la que 0= sin teñir y 4= máxima tinción. Se examinaron cuatro secciones (incluyendo el control) por sujeto por sitio. Se puntuó el grado de inmunoteñido para tres campos de alta potencia por sección, y se calculó la puntuación media para cada sitio/área de ensayo.
- 10 Para la tinción asociada a la célula, se evaluaron los números de queratocitos epidérmicos positivos por campo de alta potencia, y se calculó la puntuación media para cada sitio/área de ensayo.
- 15 Se evaluaron las diferencias en la distribución en los sitios de ensayo y después de la aplicación de las sustancias de ensayo para periodos variables de tiempo para ver la significancia usando el test de análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA). Para evaluar si los métodos de suministro afectaron a las medidas resultantes, se analizaron los datos usando los test de la t de Student pareados. Ambos modelos se analizaron usando software SPSS+ 8 (v11.5, SPSS Inc., IL, USA) tomando la significancia con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

Eritema

Todos los voluntarios toleraron bien el protocolo de ensayo del parche. Además, el RA todo-trans produjo eritema marcado en el sitio de aplicación. El eritema no se observó usando la formulación de Tópico 1.

- 20 Protocolo del ensayo del parche

IHC de fibrilina-1

La aplicación de RA todo-trans (nuestro estándar "oro") produjo la deposición de fibrilina-1 próxima a la DEJ en 3/6 voluntarios. La formulación de Tópico 1 dio como resultado la deposición incrementada de fibrilina-1 en 4/6 voluntarios ensayados pero en un nivel inferior al generalmente observado usando RA todo-trans (figura 4).

- 25 Tabla 5

Tratamiento de tinción de fibrilina-1	Media	Desviación estándar
Referencia	1,1111	0,4608
Vehículo	1,3241	0,6050
Formulación de Tópico 1	1,3704	0,9930
RA todo-trans	1,8241	0,7985

p>0,05, no significativa

IHC de MMP-1

Se observó tinción de MMP-1 tanto en la epidermis como en la dermis. La aplicación tópica general de RA todo-trans

durante 4 días bajo oclusión redujo la expresión de MMP-1 en queratinocitos epidérmicos, aunque esto no llegó a ser significativo. La aplicación de la formulación de Tópico 1 dio como resultado un nivel similar de reducción (figura 5)

Tabla 6

Tratamiento de tinción de MMP-1	Media	Desviación estándar
Referencia	12,1650	6,4340
Vehículo	7,9890	3,2898
Formulación de Tópico 1	5,0093	4,2616
RA todo-trans	5,3333	4,3165

5 $p > 0,05$, no significativa

IHC de RAR α

10 Se observó tinción de RAR α principalmente en la epidermis. La aplicación tópica general de RA todo-trans durante 4 días bajo oclusión redujo la expresión de RAR α en queratinocitos epidérmicos. La aplicación de la formulación de Tópico 1 dio como resultado un nivel similar de reducción, aunque esta no llegó a ser significativa en este conjunto de datos (figura 6)

Tabla 7

Tratamiento de tinción de RAR α	Media	Desviación estándar
Referencia	16,8370	5,7277
Vehículo	10,1111	4,1407
Formulación de Tópico 1	8,3611	5,1287
RA todo-trans	6,0463	5,1090

$p > 0,05$, no significativa

15 HSP72

La HSP72 se encuentra principalmente en la epidermis donde se observó fuerte tinción. El tratamiento con RA todo-trans incrementó significativamente la expresión de HSP72 epidérmica como lo hizo la formulación de Tópico 1 ($p = 0,005$ y $0,012$ respectivamente; figura 7).

Tabla 8

Tratamiento de tinción de HSP72	Media	Desviación estándar
Referencia	56,18	8,55
Vehículo	63,61	4,83
Formulación de Tópico 1	74,08*	17,49
RA todo-trans	77,03**	15,44

20 * $p = 0,012$

** $p = 0,005$

Protocolo de ultrasonido

Fibrilina-1

La formulación de Tópico 1 se aplicó adicionalmente al extensor del antebrazo fotoenvejecido por medio de

aplicación tópica básica sin oclusión o vía un dispositivo de ultrasonido. En todos aquellos estudiados (n=10) el suministro por ultrasonido dio como resultado un incremento significativo de la deposición de fibrilina próxima a la unión dermis-epidermis (figura 8)

Tabla 9

Tratamiento de tinción de fibrilina-1	Media	Desviación estándar
Tópico	1,8272	0,8698
Ultrasonido	2,6065*	1,0052

5

*p = 0,033

MMP-1

Se observó la tinción de MMP-1 tanto en la epidermis como en la dermis. Hubo una ligera reducción, no significativa, de la expresión de MMP-1 en queratinocitos epidérmicos después del tratamiento de ultrasonido (figura 9)

10 Tabla 10

Tratamiento de tinción de MMP-1	Media	Desviación estándar
Tópico	114,71	22,03
Ultrasonido	107,46	31,96

p = 0,05, no significativa

HSP72

15 La HSP72 mostró un ligero, pero no significativo, incremento de la expresión epidérmica después del tratamiento de ultrasonido (figura 10)

Tabla 11

Tratamiento de tinción de HSP72	Media	Desviación estándar
Tópico	56,31	16,58
Ultrasonido	67,57	16,41

p = 0,05, no significativa

Clusterina

20 La clusterina mostró un ligero, pero no significativo, incremento de la expresión dérmica después del tratamiento de ultrasonido (figura 11)

Tabla 12

Tratamiento de tinción de clusterina	Media	Desviación estándar
Tópico	1,80	0,98
Ultrasonido	1,95	1,00

p >0,05, no significativa

25 **Sumario**

La aplicación de la formulación de Tópico 1 usando un dispositivo de ultrasonido aumentó significativamente la

deposición de fibrilina proximal a la unión dermis-epidermis de la piel fotoenvejecida.

5 La expresión de la HSP72 era modulada tanto por la formulación de Tópico 1 como por el RA todo-trans. Además, el suministro con ultrasonido de la formulación de Tópico 1 también dio como resultado una expresión incrementada de la HSP72. Es posible que la expresión incrementada de proteína de choque térmico pueda ser beneficiosa para la piel, "preacondicionando" las células para hacer frente a los estresantes medioambientales (hormesis). Por consiguiente, la expresión incrementada de HSP72 por los queratinocitos epidérmicos puede estar implicada en los procesos de reparación celular después del daño.

10 Los datos sugieren que hay una reducción en la expresión de MMP-1 y RAR α en la epidermis de la piel fotoenvejecida después de la aplicación de esta formulación, esto apoya su idoneidad para uso en el tratamiento de piel envejecida.

15 Adicionalmente, se realizaron las siguientes observaciones no cuantitativas durante el curso del ensayo con relación a los tratamientos de la piel basados en ultrasonido. Aunque no es directamente comparable debido a la estructura del protocolo del ensayo, la formulación de Tópico 1 aplicada con ultrasonido parecía inducir un nivel de fibrilina similar al de la formulación de retinoide. La formulación de Tópico 1 sola y la formulación de Tópico 1 aplicada con ultrasonido no indujeron eritema o hiperplasia epidérmica, al contrario de la formulación de retinoide. El grado de cicatrices en los sitios de biopsia previamente tratados con ultrasonido era apreciablemente menor que las cicatrices en todos los otros sitios.

Referencias

- 20 1. Watson REB, Griffiths CEM, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin: Distribution at the dermo-epidermal junction. *J Invest Dermatol*, 112: 782-787, 1999
2. Watson REB, Craven NM, Kang S1 Jones CJP, Kielty CM, Griffiths CEM. A short term screening protocol, using fibriliiin-1 as a receptor molecule for photoageing repair agents. *J Invest Dermatol*, 116:672-678, 2001
- 25 3. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathuia N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalioproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol*, 78:43-48, 2003
4. Watson REB, Ratnayaka JA, Brooke RC, Yee-Sit-Yu S, Ancian P, Griffiths CEM. Retinoic acid receptor alpha expression and cutaneous ageing. *Mech Ageing Dev*, 125:465-473, 2004
5. Jantschitsch C, Trautinger F. Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin. *Photochem Photobiol Sci* 2:899-903, 2003
- 30 6. Debure L, Vayssiere JL, Rincheval V, Loison F, Le Drean Y, Michel D. Intracellular clusterin causes juxtannuclear aggregate formation and mitochondrial alteration. *J Cell Sci*. 116:3109-3121, 2003

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aparato para aplicación de ultrasonido a la piel que comprende una pluralidad de elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual dispuestos en forma de un conjunto (2) en un material (4) flexible en configuración espaciada y un generador de ultrasonido conectado al conjunto (2) transductor para energizar los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual con señales de activación, caracterizado porque cada uno de los elementos transductores de frecuencia dual es capaz de suministrar ultrasonido tanto a baja frecuencia como a alta frecuencia, en el que el generador de ultrasonido está configurado para generar señales de activación tanto de baja como de alta frecuencia para energizar los elementos transductores de frecuencia dual, en el que el conjunto transductor es programable para suministrar una secuencia deseada de ultrasonido de baja y alta frecuencia a la piel en tratamiento, en el que baja frecuencia se define como de 20 kHz a 500 kHz y alta frecuencia se define como de 0,5 MHz a 3,5 MHz.
- 10 2. Un aparato según la reivindicación 1, en el que cada uno de los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual es capaz de suministrar ultrasonido de baja y alta frecuencia simultánea o secuencialmente.
- 15 3. Un aparato según la reivindicación 2, en el que cada uno de los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual es capaz de suministrar ultrasonido de baja y alta frecuencia a lo largo de un eje común.
4. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que cada uno de los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual es capaz de suministrar ultrasonido de un modo pulsado o de un modo continuo.
- 20 5. Un aparato según la reivindicación 4, en el que el aparato es controlable de tal modo que son capaces de ser controladas bajas y altas frecuencias de modo que un campo de ultrasonido se mueve a través del conjunto (2) según un patrón predeterminado y a una velocidad predeterminada.
6. Un aparato según la reivindicación 5, en el que el patrón predeterminado comprende uno o más de: movimiento de izquierda a derecha o viceversa a través de todo lo ancho del conjunto (2); movimiento arriba y abajo; y movimiento hacia el centro del conjunto (2) y a continuación hacia afuera de nuevo.
- 25 7. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual están individualmente conectados al generador de ultrasonido.
8. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual son cada uno capaces de suministrar una frecuencia de ultrasonido baja de ~ 50 KHz.
- 30 9. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que los elementos (12, 24) transductores de frecuencia dual son cada uno capaces de suministrar una frecuencia de ultrasonido alta de ~ 1 MHz a 3 MHz
10. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que la densidad de potencia media espacial de la energía de ultrasonido de baja frecuencia es de 20 a 500 mW/cm².
11. Un aparato según cualquier reivindicación precedente, en el que la densidad de potencia media espacial de la energía de ultrasonido de alta frecuencia es de 0,5 a 3 W/cm².
- 35 12. Un kit que comprende:
 el aparato de cualquier reivindicación precedente; y
 una almohadilla de gel que contiene una composición que comprende ácido hialurónico y configurada para estar dispuesta entre el conjunto (2) flexible y un área de la piel en tratamiento.

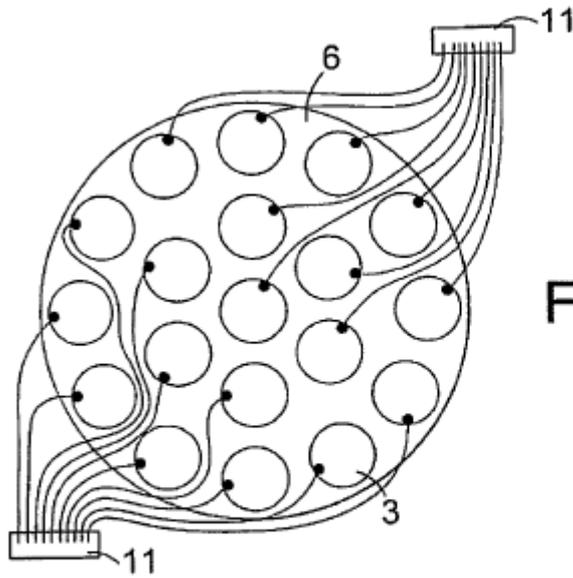


Fig.1(a)

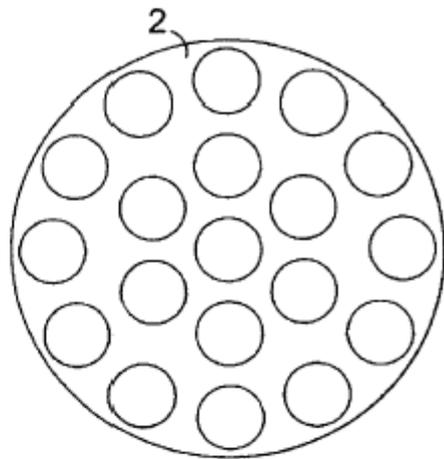


Fig.1(b)

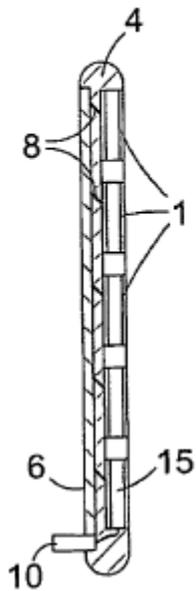


Fig.1(c)

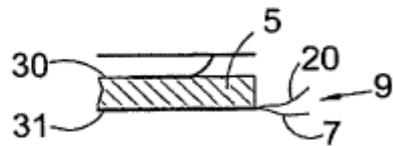


Fig.1(d)

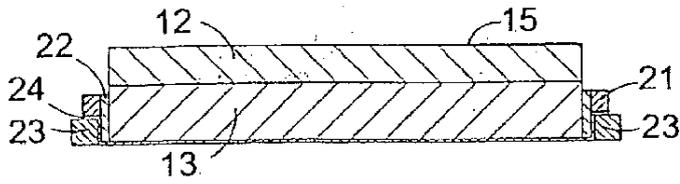


Fig.2a

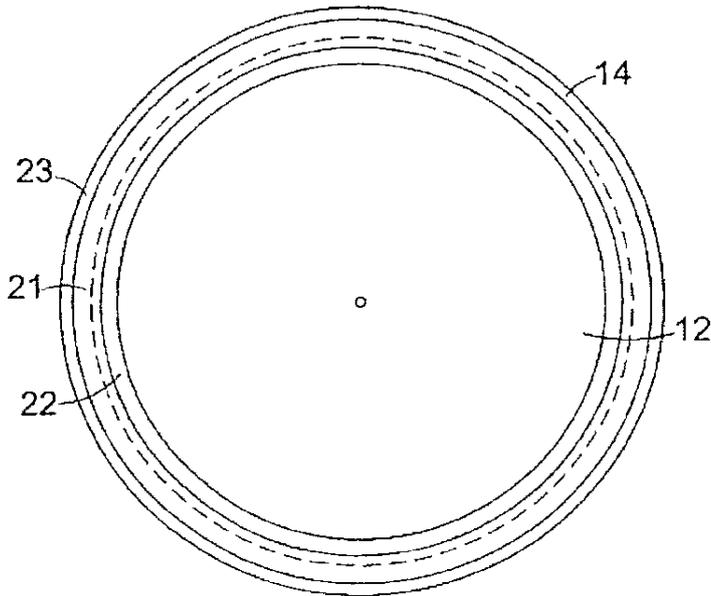


Fig.2b

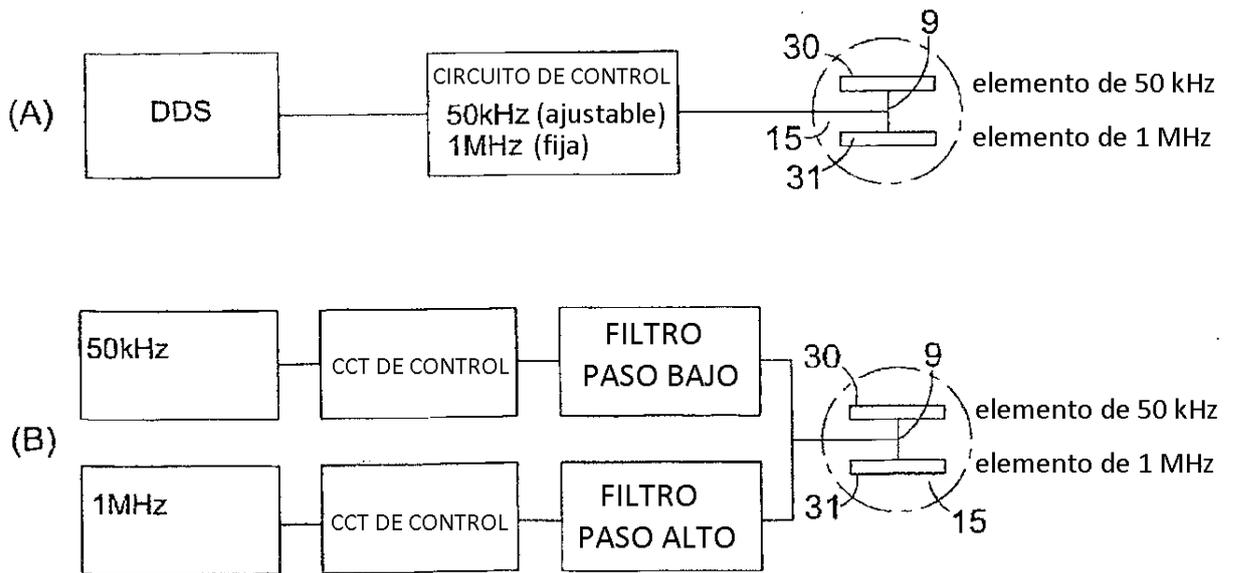


Fig.3

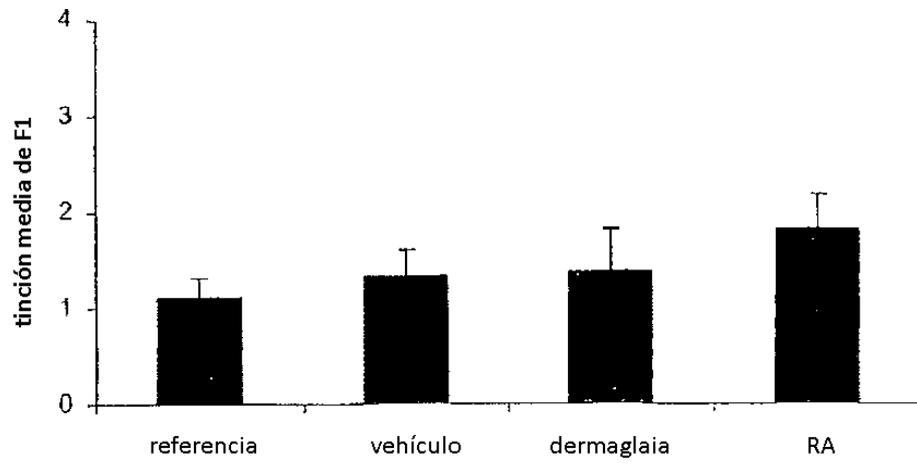


Figura 4

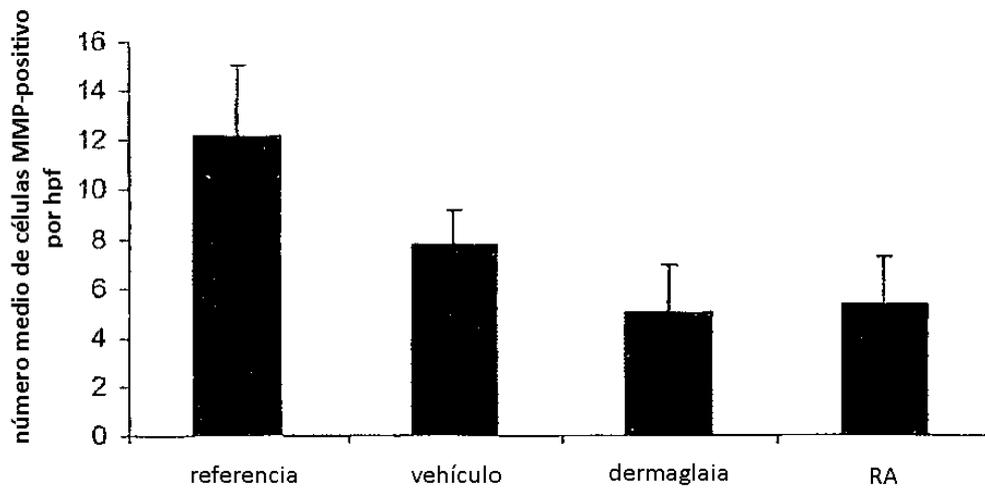


Figura 5

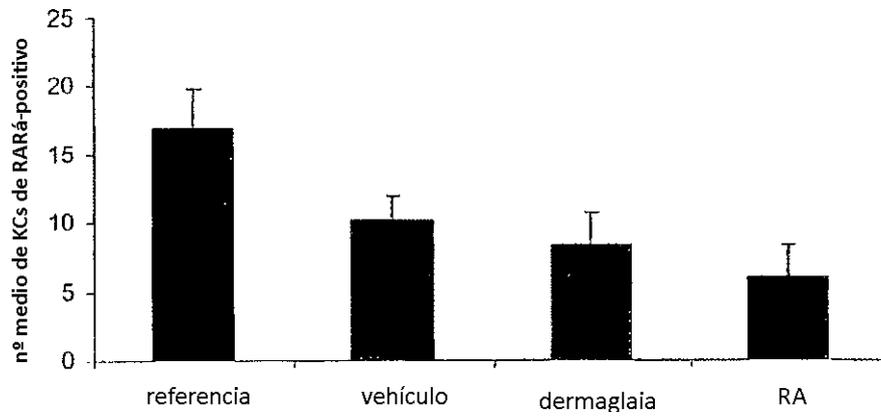


Figura 6

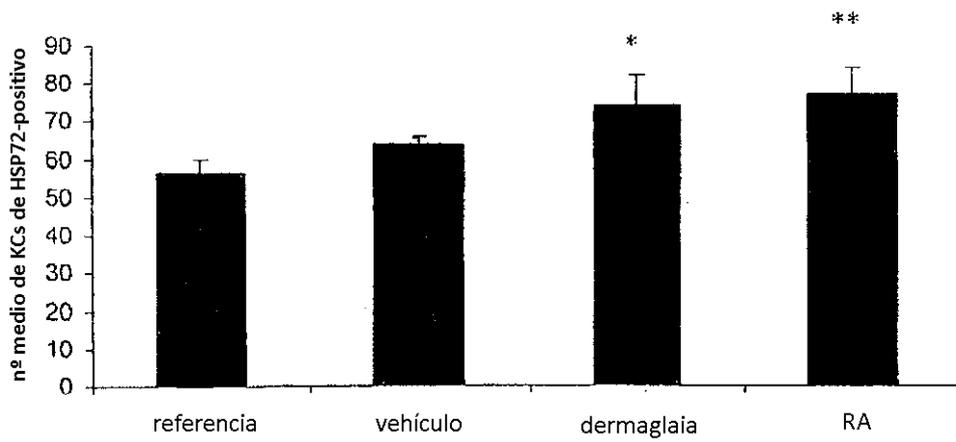


Figura 7

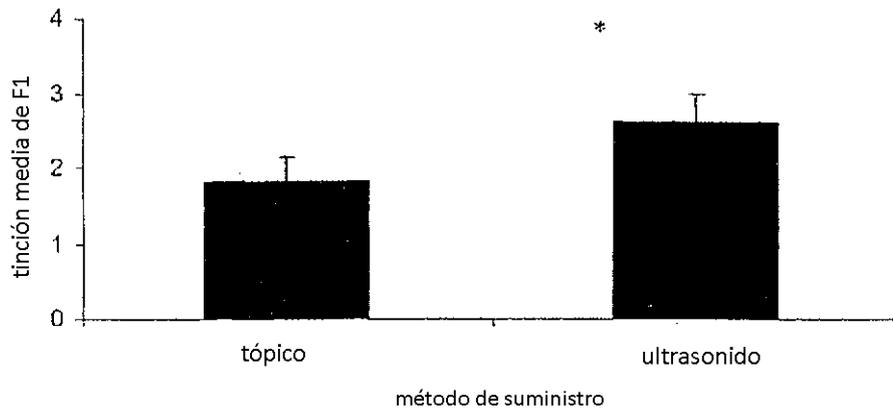


Figura 8

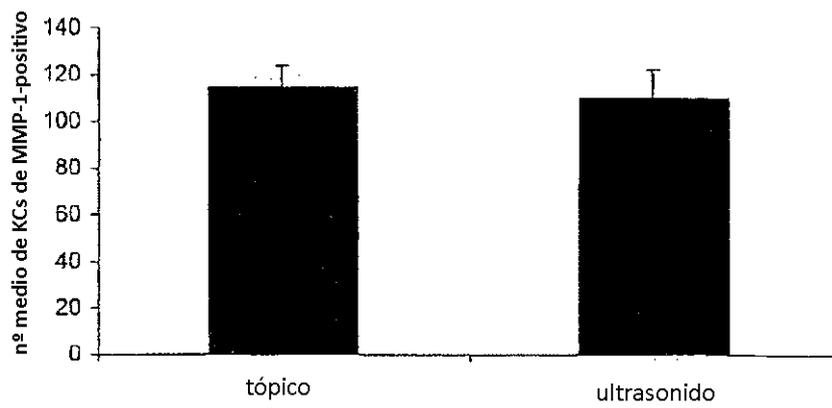


Figura 9

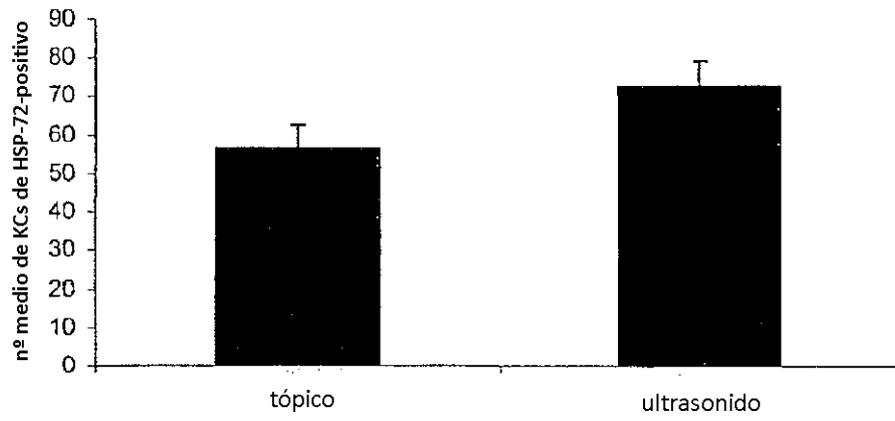


Figura 10

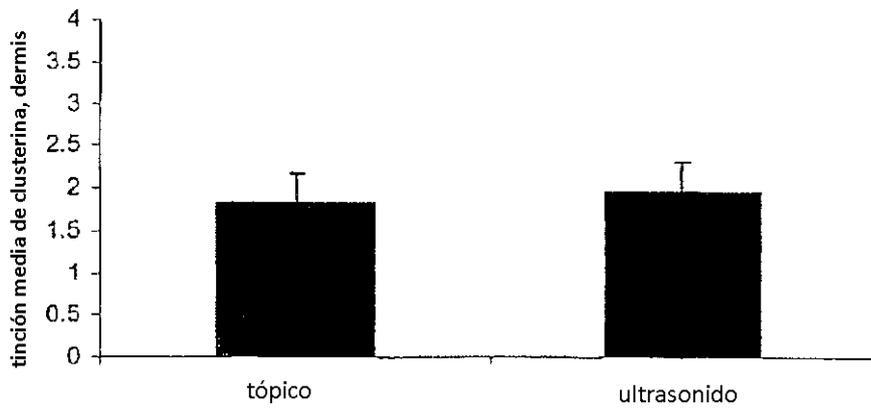


Figura 11